

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Jan Šoupal

**Biomarkery v diagnostice a terapii pozdních
komplikací diabetu**

*Biomarkers in the diagnosis and treatment of diabetic
complications*

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Martin Prázný, Ph.D., CSc.

Praha, 2017

Obsah

1. Prohlášení o samostatném zpracování disertační práce a identifikační záznam.....	4
2. Poděkování.....	5
3. Seznam použitých zkratk.....	6
4. Abstrakt.....	8
5. Abstract.....	9
6. Úvod.....	10
7. Glykemická variabilita.....	11
7.1. Metody stanovení glykemické variability.....	13
7.2. Glykemická variabilita a oxidační stres.....	16
7.3. Glykemická variabilita a její souvislost s chronickými komplikacemi diabetu.....	19
7.3.1. Krátkodobá glykemická variabilita.....	19
7.3.2. Dlouhodobá glykemická variabilita (variabilita HbA _{1c}).....	20
7.4. Glykemická variabilita u kriticky nemocných pacientů.....	22
7.5. Glykemická variabilita jako prediktor hypoglykémie.....	22
7.6. Možnosti snížení glykemické variability.....	23
8. Kontinuální monitorace glukózy.....	24
8.1. Komponenty systémů pro kontinuální monitoraci glukózy.....	25
8.2. Nastavení systémů pro kontinuální monitoraci glukózy.....	27
8.2.1. Zaslepené systémy pro kontinuální monitoraci (profesionální CGM).....	27
8.2.2. Monitorace v „reálném“ čase (Real-Time CGM, otevřený záznam).....	27
8.3. Indikace pro kontinuální monitoraci glukózy.....	28
8.4. Proces kontinuální monitorace glukózy.....	29
8.5. Pozice kontinuální monitorace v selfmonitoringu diabetu.....	31
9. Vědecké hypotézy a cíle práce	33
9.1. Vědecké hypotézy	33
9.2. Cíle práce.....	34
10. Metodika.....	35
10.1. Výpočet glykemické variability.....	35
10.2. Přístroje pro kontinuální monitoraci aglukometry.....	36
10.3. Hodnocení přítomnosti mikrovaskulárních komplikací.....	37

11. Vlastní výsledky výzkumné práce.....	38
11.1. Glykemická variabilita je vyšší u pacientů s diabetem 1. typu a mikrovaskulárními komplikacemi.....	38
11.2. Kontinuální monitorace glukózy zlepšuje kompenzaci pacientů s diabetem 1. typu v průběhu 52 týdnů léčby inzulinovou pumpou i klasickým režimem bazál-bolus: „COMISAIR study“.....	45
11.3. Vliv glykemické variability na patofyziologické dráhy spojené s glukotoxicitou: Zhodnocení nového in vitro modelu.....	53
11.4. Glykemická variabilita, glykovaný hemoglobin a mikrovaskulární komplikace	62
11.5. Kožní autofluorescence u diabetu souvisí se solubilními receptory pro konečné produkty glykace a albuminurií.....	71
11.6. Akutní hyperglykémie neovlivňuje mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u DM 1. typu v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického campu.....	79
12. Diskuze a závěr	88
12.1. Diskuze.....	88
12.2. Závěr.....	91
13. Summary.....	92
14. Vlastní publikace autora.....	96
14.1. Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce.....	96
14.2. Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce.....	96
14.3. Publikace s IF, které nejsou podkladem disertační práce.....	96
14.4. Publikace bez IF, které nejsou podkladem disertační práce.....	97
15. Použitá literatura.....	99
16. Prohlášení zájemce o nahlédnutí do disertační práce.....	107

1. Prohlášení o samostatném zpracování disertační práce a identifikační záznam

1.1. Prohlášení o samostatném zpracování disertační práce

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15.4.2017

MUDr. Jan Šoupal

1.2. Identifikační záznam

ŠOUPAL, Jan. Biomarkery v diagnostice a terapii pozdních komplikací diabetu [*Biomarkers in the diagnosis and treatment of diabetic complications*]. Praha, 2017.

107 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, 3. interní klinika. Školitel Prázný, Martin.

2. Poděkování

Tato práce vznikla na 3. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v rámci postgraduálního doktorského studijního programu v biomedicíně, v oboru Fyziologie a patofyziologie člověka.

Děkuji především svému školiteli doc. MUDr. Martinu Práznému, Ph.D., CSc. za odborné vedení studia a všestrannou podporu a pomoc. Děkuji také diabetologické skupině 3. interní kliniky, jmenovitě prof. MUDr. Janu Škrhovi, DrSc., MBA, as. MUDr. Martinu Matoulkovi, Ph.D., as. MUDr. Milanu Flekačovi, Ph.D., MUDr. Janu Škrhovi jr., MUDr. Evě Horové Ph.D. a MUDr. Tomáši Pelcovi za cenné připomínky v průběhu přípravy této disertační práce. Děkuji rovněž MUDr. Lence Petruželkové z Pediatrické kliniky FN Motol za pomoc při statistickém zpracování výsledků.

Poděkování za podporu patří také přednostovi 3. interní kliniky 1. LF UK a VFN prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., MBA a všem dalším kolegům ze 3. interní kliniky, kteří mi pomáhali v odborné přípravě.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

3. Seznam použitých zkratk

1,5-AG	1,5 - anhydroglucitol
ADA	Americká diabetická asociace
ADRR	average daily risk range
AGEs	advanced glycation end-products
CGM	kontinuální monitorace glykémie (continuous glucose monitoring)
CONGA	continous overlapping net glycemic action
CSII	continuous subcutaneous insulin infusion
CV	variační koeficient (coefficient of variation)
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	diabetes mellitus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FGM	flash glucose monitoring
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GV	glykemická variabilita
HbA _{1c}	glykovaný hemoglobin
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IF	impact factor
ICHs	ischemická choroba srdeční
KAN	kardiovaskulární autonomní neuropatie
MAGE	mean amplitude of glycemic excursions
MARD	mean absolute relative difference
MDI	multiple daily injections
MVK	mikrovaskulární komplikace
PCK	proteinkináza C
PCR	polymerázová řetězová reakce
PORH	post-okluzivní reaktivní hyperémie
PPGE	postprandiální glukózové exkurze (postprandial glucose excursion)
RT-CGM	kontinuální monitorace glykémie v reálném čase (real-time CGM)
SAP	sensor augmented pump
SD	standardní odchylka (standard deviation)

SD_T	celková standardní odchylka (total standard deviation)
SKG	selektivní koronarografie
SMBG	self-minitoring of blood glucose
sRAGE	solubilní receptor pro AGEs
TH	termální hyperémie
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
vWF	von Willebrandův faktor

4. Abstrakt

Předmětem práce bylo studium biomarkerů v diagnostice a terapii pozdních komplikací diabetu (DM). Mezi tyto ukazatele je řazena také glykemická variabilita (GV), na kterou byla naše práce zaměřena především. Zvýšená GV je spojena s vyšším výskytem hypoglykemií, možná se podílí na rozvoji pozdních komplikací DM a díky příchodu nové technologie – kontinuální monitorace glukózy (CGM) – ji nyní dokážeme lépe změřit, zkoumat, ale i ovlivnit.

Zatím není jasné, zda může zvýšená GV přispívat ke vzniku mikrovaskulárních komplikací (MVK). Dosud publikované studie hodnotily GV především z výsledků rutinního selfmonitoringu prováděného glukometry (SMBG). V první části práce jsme proto porovnali GV vypočítanou ze záznamu CGM s přítomností MVK u pacientů s DM 1. typu. Ukázalo se, že GV vypočítaná z CGM, ale nikoliv z běžného SMBG, je signifikantně vyšší u pacientů s přítomnými MVK, přestože se tito pacienti nelišili v hladině glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) ani v průměrné glykémii. Tento výsledek podporuje hypotézu, že vyšší GV může souviset s rozvojem komplikací a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace DM. Navíc se ukázalo, že stanovení GV pomocí SMBG je nepřesné.

Pro hodnocení GV zatím není akceptována žádná standardní metoda. V naší studii nepřineslo stanovení komplexnějšího parametru (MAGE) více informací proti jednodušším způsobům výpočtu (např. SD_T - celková směrodatná odchylka). SD_T lze navíc snadno použít v praxi.

Naše práce dále přispěla k představení nového modelu pro výzkum GV na tkáňových kulturách. Nový model vychází z GV skutečných pacientů s DM 1. typu a odráží tak lépe reálnou situaci. Zvýšená GV, v porovnání se setrvalou hyperglykemií, měla v této práci obdobný nebo dokonce významnější vliv na expresi řady genů zapojených v patofyziologii komplikací DM.

Výsledky naší práce tedy naznačily, že by snížení GV mohlo být významné z hlediska rozvoje komplikací. Proto jsme se v další studii zaměřili na otázku, zda je možné zvýšenou GV u DM 1. typu snížit a jaké prostředky jsou v tomto ohledu nejúčinnější. Jako první jsme v dlouhodobé prospektivní studii ukázali, že GV (stanovená pomocí SD_T) a další parametry kompenzace DM lze v současné době nejefektivněji snížit dlouhodobým používáním CGM.

Klíčová slova: glykemická variabilita, glykovaný hemoglobin, kontinuální monitorace glukózy, mikrovaskulární komplikace, diabetes mellitus 1. typu

5. Abstract

The main objective of this study was research on biomarkers used in both diagnosis and therapy of diabetic complications. The main focus of our work came to be on one of these biomarkers - glycemic variability (GV). High GV is linked with more frequent occurrence of hypoglycemia. There are even indications it might contribute to development of diabetic complications. With modern technology - continuous glucose monitoring (CGM), we are now able to reliably describe, calculate and reduce GV.

So far it is unclear whether increased GV can contribute to the development of microvascular complications (MVC) in type 1 diabetes (T1D). Studies published so far have assessed GV primarily from routine self-monitoring of blood glucose (SMBG) using glucometers.

In the light of this uncertainty, the first part of this work compares GV calculated from CGM with the presence of MVC in T1D patients. GV calculated from CGM, but not from SMBG, proved to be significantly higher in T1D patients with MVC, even though there was no significant difference in glycated hemoglobin (HbA_{1c}). This finding supports the hypothesis that higher GV is related to higher risk of MVC and that HbA_{1c} does not describe diabetes control completely. Moreover, it was shown that GV calculated from SMBG is insufficient.

There is still no fully accepted standard method of assessing GV. Our results suggest that the more complex parameters (e.g. mean amplitude of glycemic excursions - MAGE) provide no additional information over simple parameters (eg. total standard deviation - SD_T). Furthermore, SD_T can be easily used in clinical practice.

Our work has also contributed to the introduction of novel research into GV in cell cultures. The new model is based on GV profiles of actual patients and thus reflects better real T1D situations. In this study high GV had, in comparison with continuous hyperglycemia, increased or similar impact on the expression of various genes involved in the pathophysiology of MVC.

Our results suggest that decrease in GV could decrease the risk of MVC. However, the most effective tool for improving GV is unknown. Therefore, the next step was to compare four different treatment strategies for T1D based on different combinations of insulin delivery and monitoring systems. This further work showed that the most effective treatments are based on real-time CGM, irrespective of insulin delivery method.

Key words: glycemic variability, HbA_{1c}, CGM, microvascular complications, type 1 diabetes

6. Úvod

Diabetes mellitus (DM) je metabolická porucha charakterizovaná hyperglykemií a vysokým rizikem rozvoje makro- i mikrovaskulárních komplikací (Škrha J., 2009). Těsná kompenzace diabetu vede k redukci rizika rozvoje a progresu pozdních diabetických komplikací (Gubitosi-Klug RA., 2014; Stratton IM. et al., 2000; UKPDS Group, 1998).

K posouzení rizika budoucího rozvoje komplikací slouží nejčastěji glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}). Hladina HbA_{1c} ale nevyjadřuje riziko komplikací kompletně. Studie DCCT (Nathan DM et. al., 1993) provedená u pacientů s DM 1. typu ukázala, že ačkoliv intenzifikovaná inzulinová léčba snížila riziko rozvoje diabetické retinopatie o 73 % ve srovnání se standardní léčbou, vyšší hodnoty HbA_{1c} a délka trvání DM vysvětlily pouze 11 % rizika diabetické retinopatie. To znamená, že musí existovat ještě další faktory nezávislé na HbA_{1c} , které vysvětlí zbývajících 89 % (Lachin JM. et al., 2008).

HbA_{1c} je do značné míry statický parametr, vypovídající o průměrné glykémii za posledních 6-8 týdnů. Proto jedním z cílů této práce bylo vedle HbA_{1c} , popsat také dynamickou složku kompenzace - glykemickou variabilitu (GV).

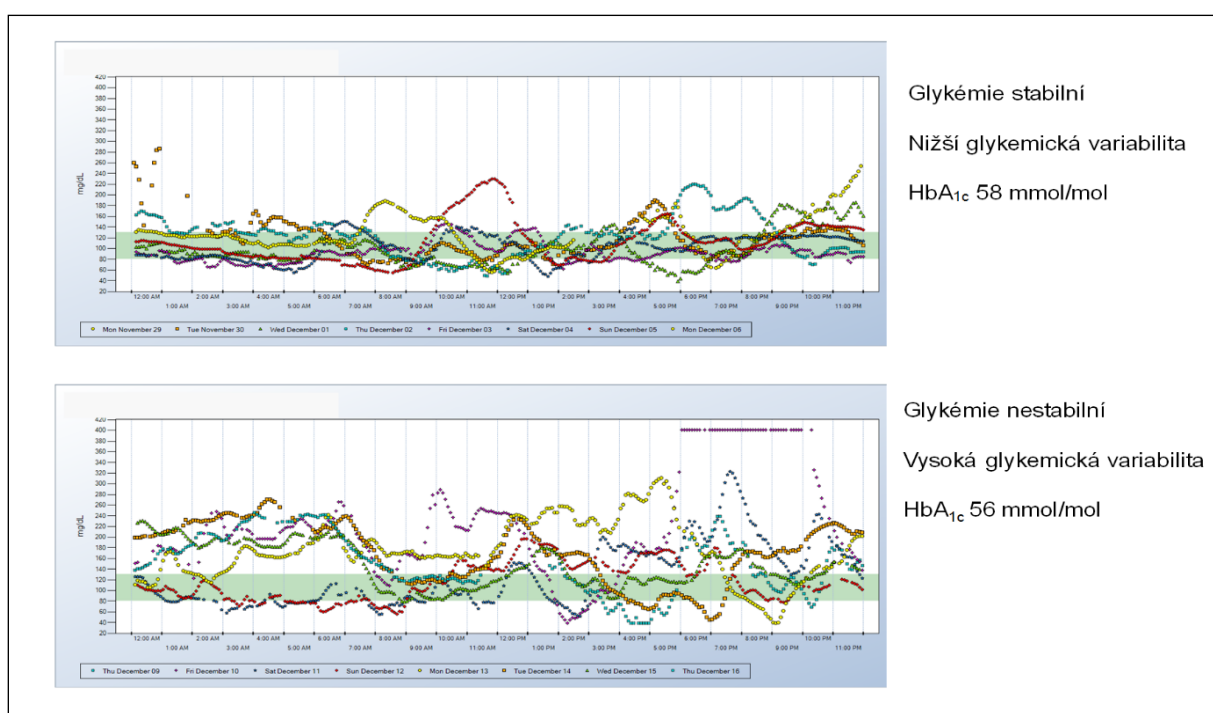
Náš výzkum se zabýval možnou souvislostí zvýšené GV s mikrovaskulárními komplikacemi DM, potenciálními patogenetickými mechanismy, kterými by mohla zvýšená GV přispívat k rozvoji komplikací a možnostmi jejího snížení.

Výsledky této práce byly publikovány v domácích i zahraničních časopisech s IF a byly prezentovány na významných českých, evropských i amerických konferencích zabývajících se problematikou diabetu.

7. Glykemická variabilita

U pacientů s DM se setkáváme s chronickou setrvalou hyperglykémií i s akutním kolísáním glykémie. Chronická hyperglykémie aktivuje oxidační stres a vede k rozvoji mikrovaskulárních a makrovaskulárních komplikací diabetu. Význam akutních změn glykémie – tzv. glykemické variability (GV) – je méně jasný.

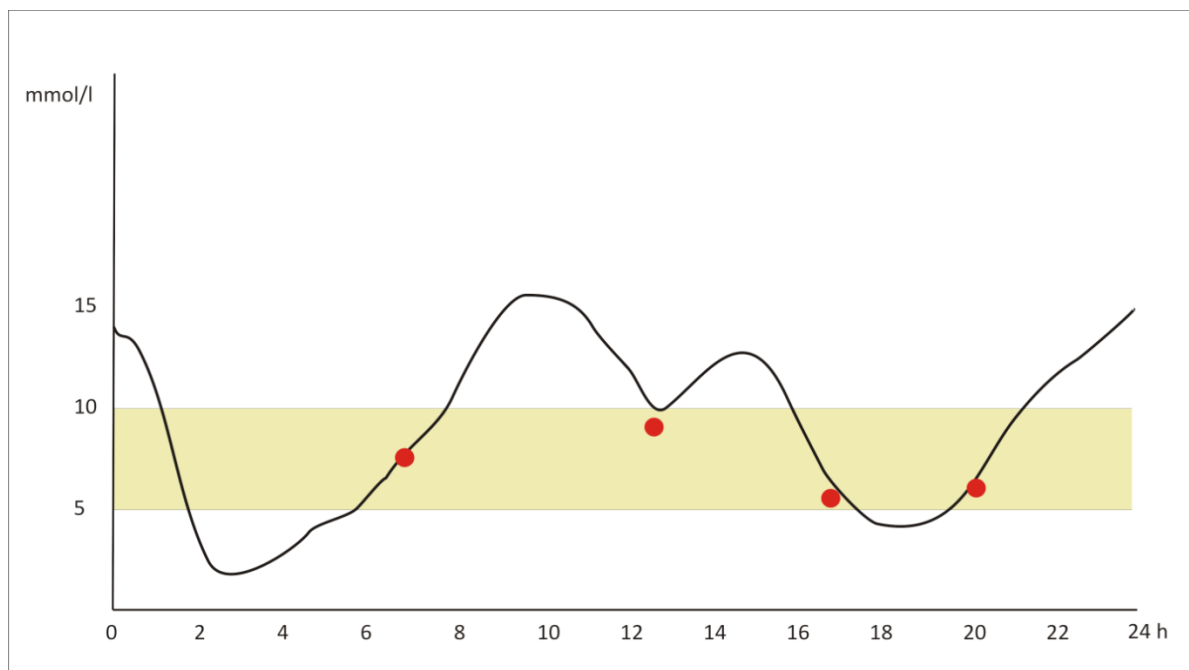
Za zlatý standard hodnocení kompenzace pacientů s diabetem je řadu let považován glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}) (Soranzo N., 2011; Gorus F. et al., 2006). V posledních letech však přibývají důkazy o tom, že HbA_{1c} nemusí popisovat míru kompenzace pacientů s diabetem dostatečně komplexně (DCCT research group, 1995). HbA_{1c} jako sumární parametr neinformuje zejména o krátkodobých změnách glykémie – GV (obrázek 1).



Obrázek č. 1: Záznamy z kontinuální monitorace glukózy pomocí glykemického senzoru dokumentují rezervy hodnocení kompenzace pacientů s DM 1. typu pouze dle HbA_{1c}. První z pacientů má nízkou a druhý vysokou glykemickou variabilitu. HbA_{1c} je ale v obou případech podobný. Každá z barevných linií odpovídá jednomu dni monitorace.

Za jeden z hlavních mechanismů vzniku specifických komplikací DM je považován oxidační stres. Setrvalá hyperglykémie aktivuje oxidační stres zvýšením produkce superoxidu např.

v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu, což spouští kaskádu dějů vedoucích ke vzniku chronických komplikací DM (Brownlee M., 2001). Podle některých studií je oxidační stres aktivován také díky zvýšené GV (Saisho Y., 2014; Monnier L. et al., 2006). Dosud nezodpovězenou otázkou zůstává, zda zvýšená GV ve svém důsledku zvyšuje i riziko rozvoje diabetických komplikací. Studie zabývající se touto problematikou jsou rozporuplné. Autoři těchto prací obvykle hodnotili GV buď nepřímo nebo analýzou dat z rutinního selfmonitoringu glykemií (SMBG – Self-Monitoring Of Blood Glucose) (Nathan DM et. al., 1993; Bragd J. et al., 2008). SMBG představuje měření glykémie z kapilární krve prováděné samotným pacientem pomocí osobního glukometru. Selfmonitoring poskytuje pacientovi aktuální informace o hodnotách glykémie, a představuje tak jeden ze základních nástrojů pro dosažení dobré kompenzace DM. Aby byl selfmonitoring u DM 1. typu efektivní, měl by být prováděn v pravidelných intervalech a s dostatečnou frekvencí (minimálně 3-4x denně). Pomocí SMBG je možné zhodnotit glykémii nalačno, postprandiální glykémii, přítomnost hypoglykemií a určit GV. Výpočet GV z klasického glykemického profilu však může být nepřesný (Kovatchev B., Cobelli C., 2016; Siegelaar SE. et al., 2010), neboť k řadě „poklesů“ a „vzestupů“ glykémie dojde bez povšimnutí i mezi jednotlivými měřeními (obrázek 2). Přesněji lze vypočítat GV analýzou kontinuálního monitorování glukózy. (CGM – Continuous Glucose Monitoring). Základem systému pro CGM je miniinvazivní senzor, který se zavádí do podkoží pomocí speciálního aplikátoru. V závislosti na typu senzoru je koncentrace glukózy v intersticiální tekutině v podkoží stanovena přibližně každých 5 minut (tj. bezmála 300 výsledků denně). S lepší dostupností a spolehlivostí systémů pro CGM se proto nyní rozšiřují možnosti přesnějšího stanovení a hodnocení významu GV (Hirsch et al., 2007; Rodbard D., 2012). Podrobněji se kontinuální monitoraci glukózy věnuje kapitola 5.2.



Obrázek č. 2: Schéma jednodenního záznamu CGM. Čtyři červené body označují glykémii zjištěnou glukometrem. Při SMBG není řada poklesů a vzestupů glykémie zaznamenána. Při CGM je možno získat v závislosti na typu senzoru bezmála 300 měření denně.

7.1. Metody stanovení glykemické variability

K hodnocení GV je možno použít několik metod, prozatím však není žádná akceptována jako univerzální (Kovatchev B, Cobelli C, 2016; Rodbard D., 2012). K výpočtu GV je možno využít data získaná klasickým selfmonitoringem glykemií (SMBG) nebo nověji data získaná kontinuálním monitoringem (CGM). Přehled některých způsobů stanovení GV je uveden v tabulce 1.

Standardní odchylka (SD) a variační koeficient (CV) představují nejjednodušší a nejpoužívanější metody výpočtu GV (Siegelhaar SE. et al., 2010). Oba parametry je možné určit z běžného glykemického profilu, což usnadňuje jejich použití v praxi. Nevýhodou však je, že i při frekvenci měření glykémie 5–7× denně (běžná doporučená frekvence je 3–4× denně a mnoho pacientů se měří i méně často) zůstane mnoho vzestupů a poklesů glykémie nezjištěno, protože zůstanou skryty mezi jednotlivými měřeními (obr. 2). Lepší je tedy kalkulace ze záznamu CGM, nicméně zajistit použití CGM u všech pacientů s DM není zatím technicky ani ekonomicky reálné. SD může být jednoduše vypočítána běžným softwarem

používaným ke zpracování dat stažených z glukometrů a senzorů pro kontinuální monitoraci glukózy.

Měření GV	Název	Vzorec	Vysvětlení symbolů	Popis metody
SD	Standardní odchylka	$\sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{k-1}}$	x_i = individual observation \bar{x} = mean of observations k = number of observations	Jednoduché stanovení Časté použití SMBG/CGMS
CV	Koeficient variace	$\frac{s}{\bar{x}}$	s = standard deviation \bar{x} = mean of observations	Jednoduché stanovení SMBG/CGMS
LBGI HBGI	Index hypo a hyperglykémie	$LBGI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n rl(BG_i)$ and $HBGI = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n rh(BG_i)$		Přehlednost Nutnost sbírání velkého množství měření při SMBG
ADRR	Average Daily Risk Range	$ADRR = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M LR^i + HR^i$		Riziko hypo i hyper SMGB Ne k intradenní GV
MAGE	Mean Amplitude of Glycemic Excursions	$\sum \frac{\lambda}{n}$ if $\lambda > v$	λ = each blood glucose increase or decrease (nadir-peak or peak nadir) n = number of observations v = 1 SD of mean glucose for 24-hr period	Často používaný Korelace s ox. str. CGMS
CONGA	Continuous Overlapping Net Glycemic Action	$\sqrt{\frac{\sum_{t=t_1}^{t_2} (D_t - \bar{D})^2}{k^* - 1}}$ where $D_t = GR_t - GR_{t-m}$ and $\bar{D} = \frac{\sum_{t=t_1}^{t_2} D_t}{k^*}$		Specificky pro CGMS Intradenní variabilita Složitý výpočet

Tabulka č. 1: Přehled metod stanovení glykemické variability a vzorců jejich výpočtu

Standardní odchylka (SD) a variační koeficient (CV) představují nejjednodušší a nejpoužívanější metody výpočtu GV (Siegelar SE. et al., 2010). Oba parametry je možné určit z běžného glykemického profilu, což usnadňuje jejich použití v praxi. Nevýhodou však je, že i při frekvenci měření glykémie 5–7× denně (běžná doporučená frekvence je 3–4x denně a mnoho pacientů se měří i méně často) zůstane mnoho vzestupů a poklesů glykémie nezjištěno, protože zůstanou skryty mezi jednotlivými měřeními (obr. 2). Lepší je tedy kalkulace ze záznamu CGM, nicméně zajistit použití CGM u všech pacientů s DM není zatím technicky ani ekonomicky reálné. SD může být jednoduše vypočítána běžným softwarem používaným ke zpracování dat stažených z glukometrů a senzorů pro kontinuální monitoraci glukózy.

M-index popsali v r. 1964 Schlichtkrull et al. Cílem bylo vypočítat především postprandiální GV a v době, kdy nebyl znám HbA_{1c}, kvantifikovat kompenzaci pacientů s DM 1. typu. Výpočet je založen na měření stability vzestupů a poklesů glykémie v porovnání s ideální hodnotou glykémie. Volba ideální hodnoty glykémie je ponechána na stanovujícím lékaři, což

ovšem znesnadňuje porovnání různých studií s odlišnou volbou ideální hladiny glykémie. Hodnota 0–18 ukazuje dobrou kompenzaci, hodnoty od 19 do 31 odrážejí kompenzaci uspokojivou a konečně hodnoty nad 32 jsou považovány za neuspokojivé. Nevýhodou M-indexu je, že jeho hodnota stoupá nejen při zvýšení GV, ale také při horší kompenzaci obecně. Je tedy obtížné rozlišit pacienty, kteří mají spíše vysoké průměrné glykémie, od pacientů, kteří mají vysokou GV. M-index je navíc významněji ovlivněn hypoglykemií než hyperglykemií.

Michaelisův index (glykemický index, GCI) byl poměrně hojně využíván především v osmdesátých letech dvacátého století. Sloužil nejen k odhadu glykemické variability, ale také k odhadu celkové kompenzace. K výpočtu se využívají hodnoty získané z velkého glykemického profilu, obvykle 7–11 měření. Hodnota nižší než 10 odráží dobrou kompenzaci, hodnoty od 10 do 20 ukazují kompenzaci uspokojivou, neuspokojivou kompenzaci diabetu pak indikují hodnoty vyšší než 20.

Mean amplitude of glycemie excursions (MAGE) je často používaná metoda stanovení GV, kterou navrhli Service et al. již v r. 1970. Pomocí MAGE lze vypočítat průměrnou velikost fluktuace glykémie mezi sousedními vzestupy a poklesy glykémie během dne. Jako referenční hodnota zde neslouží arbitrárně zvolená ideální hodnota glykémie, ale střední hodnota glykémie. MAGE ale ve výpočtu cíleně ignoruje exkurze glykémie menší než 1 SD. Může se tak stát, že nemusejí být zaznamenány menší, ale potenciálně důležité výkyvy glykémie. MAGE je v současné době využíván především ke stanovení GV z CGM. Určitým nedostatkem MAGE může být arbitrární definice signifikantních vzestupů a poklesů glykémie, která je nekonzistentní mezi jednotlivými pacienty. U jednoho pacienta může být například jeden ze vzestupů glykémie nižší než 1 SD glykémie během sledovaného období, a proto je ignorován, zatímco u druhého pacienta může být numericky shodný vzestup již vyšší než hodnota 1 SD a proto je považován za signifikantní. V praxi to znamená, že ačkoliv budou různí pacienti vystaveni biologicky identické sledované situaci, u některých nebude tato událost parametrem MAGE zaznamenána.

Continuous overlapping net glycemie action (CONGA-n) vytvořili v r. 2004 McDonnell et al. k hodnocení intradenní GV ze záznamu CGM. Je spočítán jako SD rozdílu mezi současnou hodnotou glykémie a glykemií, která předcházela o n hodin. Parametr CONGA je považován některými autory za objektivnější než parametr M-value nebo MAGE, protože nevyžaduje

uměle určenou hodnotu glykémie, na které se výpočet zakládá. Obvykle je užívána CONGA-1, CONGA-2 a CONGA-4, ale není jasné, která hodnota by měla být preferována.

Average daily risk range (ADRR) je parametr publikovaný v r. 2006 Kovatchevem (Kovatchev BP. et al., 2006) s cílem eliminovat nedostatky jiných parametrů (SD, M-index), které vyžadují normální distribuci glykemií. Rozsah hyperglykemického rozmezí ($> 10\text{--}33$ mmol/l) je přitom podstatně širší než rozmezí hypoglykemické ($< 3,9$ mmol/l). Proto bylo snahou popsat parametr, který bude srovnatelně citlivý pro vysoké i nízké hodnoty glykémie. Parametr ADRR je možno vypočítat z klasického selfmonitoringu glykemií prováděného po dobu asi 2–4 týdnů s frekvencí tři a více měření denně. Hodnoty ADRR < 20 jsou nízké, hodnoty 20–40 odrážejí zvýšenou GV a konečně hodnoty > 40 ukazují vysokou míru kolísání glykemií.

V minulých letech byla publikována také práce využívající k odhadu GV biomarkr *1,5-anhydroglucitol* (1,5-AG) (Kishimoto M. et al., 1995). 1,5-AG je polyol, jehož plazmatická koncentrace je stabilní při glykémii pohybující se ve fyziologickém rozmezí. Jeho zpětné vstřebávání v ledvinách je inhibováno při zvýšené exkreci glukózy do moči, při hyperglykémii se tedy plazmatická koncentrace 1,5-AG snižuje. Glykosurii detekujeme při glykémii v rozmezí 8,8–10,5 mmol/l, proto 1,5-AG není vhodný k určení krátkodobých změn glykémie oscilujících pod touto hranicí. Z tohoto důvodu je stanovení koncentrace 1,5-AG využitelné pro určení významnějších hyperglykemických exkurzí, například k hodnocení postprandiální GV u pacientů s HbA_{1c} vyšším než 65 mmol/mol. V ostatních případech se použití tohoto ukazatele ukazuje jako nepřesné a využívá se velmi málo (Siegelaaar SE. et al., 2010).

7.2. Glykemická variabilita a oxidační stres

Současná hypotéza o patogenezi chronických komplikací DM předpokládá, že nejdůležitější úlohu sehrává chronická setrvalá hyperglykémie. Ta vede k aktivaci oxidačního stresu zvýšením produkce superoxidu zejména elektronovým transportním řetězcem (dýchacím řetězcem) v mitochondriích. Nadměrná produkce superoxidu inhibuje klíčový enzym glykolýzy – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH). Inhibicí GAPDH je zahájena kaskáda dějů vedoucích ke spuštění čtyř hlavních mechanismů tkáňového poškození. Těmito

mechanizmy jsou zvýšení aktivity polyolové dráhy, zvýšení intracelulární produkce prekurzorů AGE (Advanced Glycation End products), aktivace proteinkinázy C (PKC) a zvýšení aktivity hexosaminové dráhy (Brownlee M., 2001). V několika studiích vedla zvýšená GV k aktivaci oxidačního stresu. Patofyziologické studie na zvířecích modelech a tkáňových kulturách lidských buněk prokazují vyšší aktivaci oxidačního stresu při zvýšené GV v porovnání s hyperglykemií setrvalou. Tyto závěry ale často nebyly u pacientů s DM potvrzeny klinickými studiemi (Siegelar SE. et al., 2010). Účinky vysoké GV na tkáňové kultury se zabývalo několik experimentálních studií. Tyto práce porovnávaly tři skupiny tkáňových kultur. Dvě skupiny byly vystavené roztokům glukózy o neměnné koncentraci (hyperglykemické, euglykemické médium) a u třetí skupiny se v pravidelných intervalech měnila dvě média o různé koncentraci glukózy. Přehled některých studií provedených na tkáňových kulturách a zvířecích modelech je uveden v tabulce 2.

V několika studiích byla zkoumána souvislost oxidačního stresu a GV vypočítané ze záznamu CGM. K výpočtu GV posloužil MAGE, jako marker oxidačního stresu byla měřena 24hodinová exkrece specifického isoprostanu 8-iso-PGE₂α v moči. První studie prokázala významnou korelaci mezi GV a oxidačním stresem u pacientů s DM 2. typu (Monnier L. et al., 2006). Tento výsledek ale nebyl navzdory předpokladům potvrzen u pacientů s DM 1. typu (Wentholt IM. et al., 2008), přestože DM 1. typu bývá spojen s vyšší GV. Porovnání obou prací je však problematické, protože v každé studii byl použit odlišný způsob stanovení isoprostanu v moči.

Za časný ukazatel rizika aterosklerotického poškození tepen je považována endotelová dysfunkce (Salisbury D., Bronas U., 2015; Horová E., Prázný M., 2009). K dysfunkci endotelu může vést také náhlé kolísání glykémie především po jídle (Ceriello A. et al., 2002). V současné době je postprandiální hyperglykémie považována za nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění (Ceriello A. et al., 2005). Vysoká míra kolísání glykemií nemusí poškozovat organismus pouze aktivací oxidačního stresu, dalším patogenetickým mechanismem může být například i reaktivní zvýšení kontraregulačních hormonů (adrenalin, noradrenalin) při hypoglykémii. Tyto hormony mohou způsobit vasokonstrikci a zvýšení agregace trombocytů (De Fronzo RA. et al., 1980) a zvyšovat tak kardiovaskulární riziko.

Glykemická variabilita - přehled experimentálních studií na tkáňových kulturách a zvířecích modelech		
Studie na tkáňových kulturách		
<i>Autoři</i>	<i>Tkáňová kultura</i>	<i>Závěr</i>
Quagliaro L. et al., 2003 Piconi L. et al., 2006	Endotelové buňky lidské umbilikální vény	Vysoká GV zvyšuje oxidační stres a stimuluje apoptózu
Takeuchi A. et al., 1995	Mesangiální buňky myších ledvin	Vysoká GV vedla ke zvýšení proliferace a produkce extracelulární matrix
Jones SC. et al., 1999	Proximální tubulární buňky a kortikální fibroblasty lidských ledvin	Vysoká GV i stabilní hyperglykemické prostředí vedlo k obdobnému zvýšení proliferace i produkce extracelulární matrix ale v tkáňové kultuře vystavené GV byla vyšší produkce cytokinů účastnících se syntézy kolagenu, apoptózy a rozvoje diab. nefropatie
Studie na myších modelech		
<i>Autoři</i>	<i>Design</i>	<i>Závěr</i>
Horváth EM. et al., 2009	Dvě skupiny: - Neléčený DM - DM léčený intermitentně inzulínem	U intermitentně léčených myší bylo zdokumentováno poškození funkcí endotelu

Tabulka č. 2: Přehled studií zabývajících se vlivem glykemické variability na tkáňové kultury a zvířecí modely.

7.3. Glykemická variabilita a její souvislost s chronickými komplikacemi diabetu

7.3.1. Krátkodobá glykemická variabilita

Bez ohledu na patofyziologické mechanismy je pro klinickou praxi velmi důležitou otázkou, zda GV ovlivňuje morbiditu a mortalitu pacientů s DM. Souvislost krátkodobé GV se specifickými komplikacemi DM se začala diskutovat především poté, co byly publikovány výsledky studie DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) (Siegelar SE. et al., 2010), do které bylo zahrnuto 1441 pacientů s DM 1. typu. První analýzy ukázaly rozdílný výskyt mikrovaskulárních komplikací u pacientů s podobnou hodnotou HbA_{1c}, léčených konvenčním nebo intenzifikovaným inzulínovým režimem (Nathan DM et. al., 1993). Rozdíl mezi oběma skupinami byl přičítán odlišné GV. O 10 let později však statistici studie DCCT přehodnotili své předchozí závěry a vztah vyšší krátkodobé GV a retinopatie označili za nesignifikantní. I přesto nebyla hypotéza o možné souvislosti GV s aktivací oxidačního stresu a chronickými komplikacemi DM opuštěna (Lachin JM. et al., 2008).

Zajímavou prospektivní studii na kohortě 100 pacientů s DM 1. typu publikovali Bragd et al. (Bragd J. et al., 2008). GV zde byla vypočítána ze SMBG. Výskyt mikrovaskulárních komplikací včetně periferní neuropatie byl hodnocen po dobu jedenácti let. Studie prokázala pozitivní korelaci mezi výskytem periferní neuropatie a GV vyjádřenou pomocí SD. Tyto závěry sice nebyly potvrzeny další retrospektivní analýzou dat studie DCCT (Siegelar SE. et al., 2009), ale postupně se objevují i jiné práce, které na možnou souvislost krátkodobé GV a diabetické neuropatie poukazují. Nedávno byla publikována studie, ve které krátkodobá GV, vyjádřená pomocí parametru MAGE, pozitivně korelovala s funkcí axonů motorických i senzorických nervů pacientů s DM 1. typu (Kwai NC. et al., 2016). Důležité je, že GV zde byla vypočítána z dat, která byla získána kontinuálním monitoringem glykémie.

Často podceňovanou komplikací DM je také autonomní diabetická neuropatie. Je známo, že prodloužené vyprazdňování žaludku může u pacientů s diabetickou gastroparézou zvýšit GV (Sharma D. et al., 2011). Ukazuje se, že i naopak akutní kolísání glykémie může u pacientů s DM 1. typu ovlivňovat motilitu žaludku (Samsom M. et al., 1997). Zvýšená GV v pásmu hypoglykémie hodnocená podle CGM, rovněž u pacientů s DM 1. typu, byla nezávisle asociovaná s předčasnou ejakulací (Bellastella G. et al., 2015). Mechanismus tohoto jevu je

nejasný, ale může být spojen se změnami v serotoninergní signalizaci (Martín-Cora FJ. et al. 2002). Jako nepřímý marker kardiovaskulární autonomní neuropatie byla studována variabilita srdečního rytmu u 31 pacientů s DM 1. typu. Mezi variabilitou R-R intervalu a různými parametry GV byl nalezen významný vztah jak ve dne, tak i v noci (Iwasaki S. et al., 2015). Diabetická neuropatie je běžnou komplikací také u DM 2. typu. Pacienti mají často porušené vibrační cití již v době diagnózy DM, ačkoliv jejich HbA_{1c} je pouze mírně zvýšený. Zajímavá studie byla provedena u dobře kompenzovaných pacientů s DM 2. typu (HbA_{1c} < 53 mmol/mol) (Xu F. et al. 2014). Ukázalo se, že pacienti se známou neuropatií mají významně vyšší krátkodobou GV hodnocenou podle SD a MAGE ve srovnání s pacienty bez neuropatie. V této studii byl MAGE pro diabetickou polyneuropatii nezávislým rizikovým faktorem. V jiné studii byla u pacientů s DM 2. typu zkoumána krátkodobá GV vypočítaná pomocí CGM. Multivariační analýza ukázala významnou nezávislou asociaci krátkodobé GV s přítomností kardiovaskulární autonomní neuropatie (Xu F. et al. 2014). Na základě výsledků uvedených studií je tedy možné, že periferní nervový systém by mohl být vůči GV citlivější.

V roce 2011 byla publikována studie, ve které byla hodnocena souvislost GV s přítomností a závažností ischemické choroby srdeční (ICHS) u pacientů s DM 2. typu (Su G. et al., 2011). Do studie bylo zařazeno 344 pacientů s DM 2. typu a bolestí na hrudi, pro kterou byla indikována selektivní koronarografie (SKG). Před SKG byl pacientům nasazen glykemický senzor a z výsledků pak vypočítána GV. Ve studii se ukázalo, že nemocní s ICHS měli signifikantně vyšší GV vypočítanou pomocí MAGE a PPGE (postprandial glucose excursion). Také závažnost postižení koronárního řečiště, stoupala s mírou GV. Důležité je, že mezi oběma skupinami nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly v hodnotě HbA_{1c} a hodnotou glykémie nalačno. Výsledky této studie tedy ukazují na možnou souvislost krátkodobé GV s přítomností a mírou aterosklerotických změn.

7.1.2. Dlouhodobá glykemická variabilita (variabilita HbA_{1c})

V souvislosti s výzkumem krátkodobé GV je nyní více zkoumáno i dlouhodobé kolísání kompenzace diabetu podle variability HbA_{1c}. Nedávno byla publikována metaanalýza, která hodnotila vliv dlouhodobé GV na retinopatii, nefropatii, makrovaskulární příhody a mortalitu (Gorst C. et al., 2015). Sedm studií u pacientů s DM 1. typu ukázalo asociaci variability HbA_{1c} s progresí renálního postižení (RR 1,56, 95% CI 1,08–2,25), retinopatií (RR 2,11, CI 1,54–2,89) a kardiovaskulárními příhodami (RR 1,98, CI 1,39–2,82). Analýza 13 studií u

pacientů s DM 2. typu (Gorst C. et al., 2015) ukázala, že variabilita HbA_{1c} je spojena s vyšším výskytem jak renálního postižení (RR 1,34; CI 1,15–1,57), tak i makrovaskulárních příhod (RR 1,21; CI 1,06–1,38).

Podobný vztah ($p=0,02$) byl nalezen mezi dlouhodobou GV a makrovaskulárními komplikacemi u pacientů s DM 2. typu ve studii ADVANCE (Hirakawa Y. et al., 2014), zatímco pro krátkodobou GV byl ve stejné studii nalezen vztah s mikrovaskulárními i makrovaskulárními komplikacemi ($p=0,005$).

U pacientů s DM 1. typu bylo ve studii DCCT (Kilpatrick ES. et al., 2008) dokumentováno zvýšení rizika retinopatie nejen s vyšší průměrnou hodnotou HbA_{1c}, ale také s jeho vyšší variabilitou. Pro každé zvýšení směrodatné odchylky HbA_{1c} o jedno absolutní procento poměr rizika pro vývoj a progresi retinopatie stoupl o více než 100 % (HR 2,26 pro každé absolutní % vzestupu SD HbA_{1c} [95% CI 1,63–3,14, $p<0,0001$]). Velká multicentrická analýza u 35 891 pacientů s DM 1. typu ukázala, že variabilita HbA_{1c} je rizikovým faktorem pro diabetickou retinopatii nezávisle na průměrné kompenzaci diabetu (Hermann JM. et al., 2014). Hietala et al. publikovali data ukazující, že riziko diabetické retinopatie do stadia, kdy je nutné její laserové ošetření, závisí na variabilitě HbA_{1c} (Hietala K. et al., 2013). Podobně jako u retinopatie byl ve studii DCCT popsán také významně vyšší výskyt nefropatie se stoupající variabilitou HbA_{1c}. Pro každé zvýšení SD HbA_{1c} o jedno absolutní procento riziko nefropatie stoupá o 80 % (HR 1,80, 95% CI 1,37–2,42, $p<0,0001$) (Kilpatrick ES. et al., 2008). U dětských pacientů s DM 1. typu byl v prospektivní studii o délce trvání 9 let nalezen významný vztah mezi rozvojem albuminurie a neuspokojivou a variabilní kompenzací DM hodnocenou podle variačního koeficientu HbA_{1c} (Nazim J. et al. 2014).

U pacientů s DM 2. typu byla v prospektivní studii, která trvala 6,2 roku a zahrnovala 821 pacientů, zjištěna progredující albuminurie u pacientů s vyšší dlouhodobou GV (Hsu CC. et al., 2012). SD HbA_{1c} byla nezávislým rizikovým faktorem spojeným s rozvojem albuminurie již po 2 letech sledování. Ve velké kohortě pacientů s DM 2. typu popsali Penno et al. (Penno G. et al., 2013) negativní ovlivnění albuminurie vysokou dlouhodobou GV nezávisle na průměrné hodnotě HbA_{1c}. Variabilita HbA_{1c} byla prediktorem rozvoje makroalbuminurie a snížené glomerulární filtrace u pacientů v pokročilých stádiích diabetické nefropatie.

V současnosti stoupá zájem o výzkum kardiovaskulární autonomní neuropatie (KAN) jako potenciální komplikace přispívající k náhlé smrti pacientů s diabetem. Případná souvislost KAN a dlouhodobé GV byla prozatím hodnocena pouze v jedné studii u pacientů s DM 2. typu. V této studii multivariační analýza ukázala významnou nezávislou asociaci variability HbA_{1c} s přítomností i závažností KAN (Jun JE. et al. 2015).

7.4. Glykemická variabilita u kriticky nemocných pacientů

U kriticky nemocných je velice častým nálezem tzv. stresová hyperglykémie (hyperglykémie kriticky nemocných). V minulosti byla stresová hyperglykémie mylně považována za protektivní a adaptační reakci organismu na akutní stres. V roce 2001 se však ukázalo, že hyperglykémie je u akutních stavů spojena s vyšší morbiditou a mortalitou a že intenzivní inzulinová terapie vede u vybrané skupiny pacientů k jejich snížení (Van den Berghe G. et al., 2001). Několik velkých studií (Egi M. et al., 2006; Krinsley JS., 2008) také potvrdilo, že zvýšená GV je u kriticky nemocných pacientů významným prediktorem mortality nezávislým na tíži kritického stavu a výši průměrné glykémie (Siegelaa SE. et al., 2010). Překvapivě se ukázalo, že mortalita je zvýšená pouze u podskupiny pacientů bez anamnézy DM. Tyto nálezy mohou naznačovat, že nemocní s DM jsou na akutní fluktuace glykémie lépe adaptovaní.

7.5. Glykemická variabilita jako prediktor hypoglykémie

Hypoglykémie je hlavním limitujícím faktorem léčby diabetu (Cryer PE. et al., 2003). Na následky hypoglykémie umírá poměrně velký počet pacientů s DM (Cryer PE., 2012). Riziko hypoglykémie přitom roste při snaze o co nejlepší kompenzaci diabetu (Nathan DM et. al., 1993). Častěji se s ní setkáváme u pacientů s DM 1. typu (DCCT research group, 1997), ale s novými možnostmi léčby a častějším používáním inzulinu stoupá její výskyt i u pacientů s DM 2. typu (Henderson JN. et al., 2003). Odhadnout riziko hypoglykémie je poměrně obtížné. Výskyt hypoglykémie stoupá s mírou kolísání glykemií, proto jsou parametry popisující GV dobrým prediktorem hypoglykémie (Kovatchev B., Cobelli C., 2016; Jaha GS. et al., 2005; Kudva YC. et al., 2007). V roce 1994 publikovali Cox et al. studii, ve které zjistili, že GV je významnějším prediktorem závažné hypoglykémie než HbA_{1c}. Zatímco podle hodnoty HbA_{1c} lze predikovat přibližně 8% hypoglykemií (DCCT research group, 1997), parametry popisující GV umožňují predikci až 40–50 % hypoglykemií (Kovatchev BP. et al., 1998; Kovatchev BP. et al., 2002). Podle Americké diabetické asociace (ADA) poskytuje predikce hypoglykémie založená na hodnotě HbA_{1c} a výskytu závažné hypoglykémie v anamnéze horší výsledky ve srovnání s predikcí založené na GV. Více než 50 % hypoglykemií může být predikováno výpočtem GV již z dat získaných pouhým rutinním měřením glykemií glukometrem (ADA Workgroups on Hypoglycemia, 2005).

7.6. Možnosti snížení glykemické variability

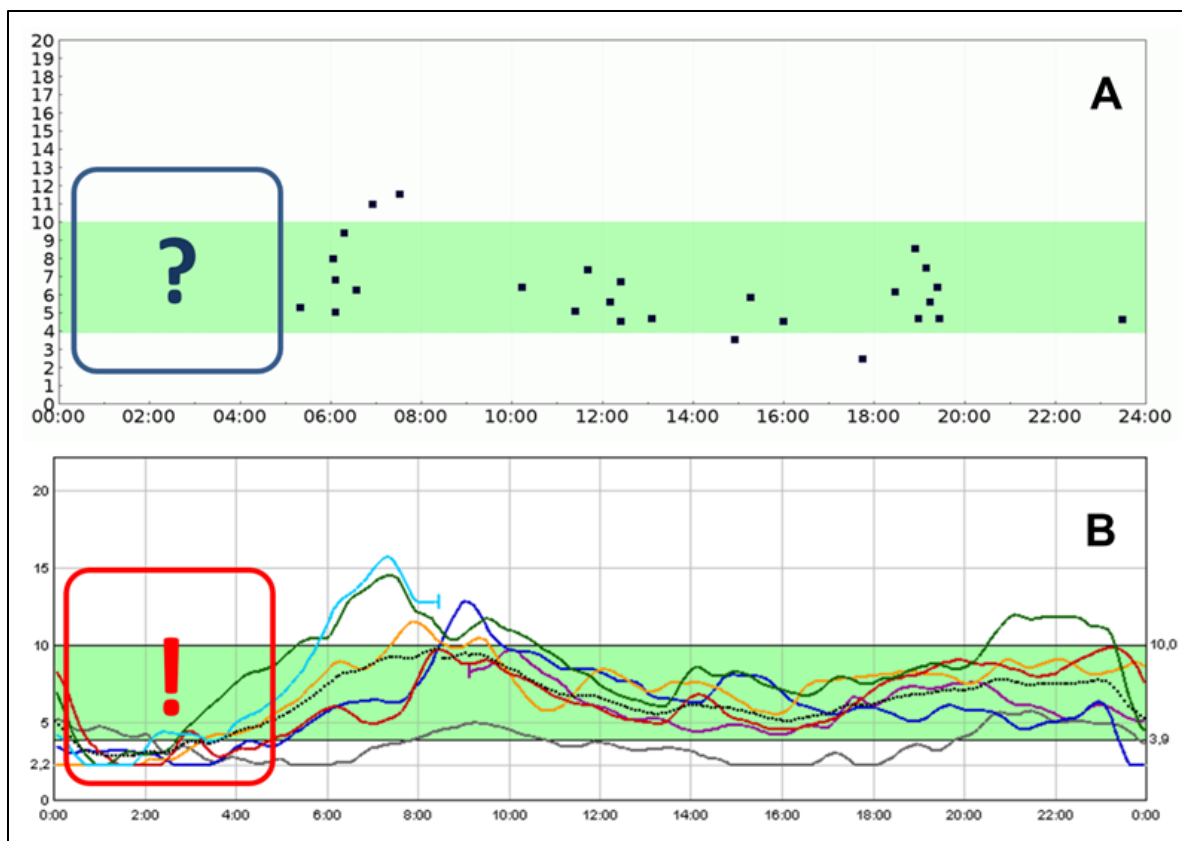
U kriticky nemocných nediabetických pacientů je ke korekci hyperglykémie metodou volby kontinuální nitrožilní infuze inzulínu lineárním dávkovačem, eventuálně doplněná bonusy. K léčbě se používá pouze krátkodobě působící inzulín. Nutností je použití kvalitního inzulínového protokolu umožňujícího pružně reagovat na mnohdy extrémní výkyvy glykémie (Šoupal J., Prázný M., 2011). Snížení GV variability u pacientů s DM není v klinické praxi jednoduché. U nemocných, kteří prodělali závažnou hypoglykémii, je nutné snížit dávky inzulínu. Je ovšem třeba mít na mysli, že snížení dávek může potencionálně vést ke zhoršení kompenzace (DCCT research group, 1996). Cílem léčby je proto zvolit bezpečné cílové pásmo glykémie, při kterém je v rovnováze terapeutická snaha o normoglykémii a riziko výskytu hypoglykémie. Z několika prací je patrné, že léčba dlouhodobě působícími inzulínovými analogy snižuje u pacientů s DM 1. i 2. typu glykemickou variabilitu i výskyt hypoglykemií (Yamamoto C. et al., 2016; White NH. et al., 2009; Hermansen K. et al., 2006;). Obdobně vede zejména u pacientů s DM 2. typu léčba krátkodobě působícími inzulínovými analogy, k redukci GV, především díky snížení postprandiální hyperglykémie (Anderson Jr JH. et al., 1997; Kang S. et al., 1991). U pacientů s DM 2. typu byla také srovnávána léčba GLP-1 agonistou exenatidem s dlouhodobě působícím inzulínovým analogem glarginem. Léčba exenatidem vedla při srovnatelném HbA_{1c}, k vyšší redukci GV (McCall AL. et al., 2009). U pacientů s DM 1. typu lze také dosáhnout významného snížení GV převedením nemocných z intenzifikovaného inzulínového režimu na kontinuální infúzi inzulínovou pumpou (CSII) (Bruttomesso D. et al., 2008; Alemzadeh R. et al., 2007), i když i v tomto ohledu nejsou klinické studie jednoznačné. V současné době proto nelze s jistotou tvrdit, zda snížení GV přináší u této skupiny nemocných také snížení rizika vzniku specifických komplikací diabetu. Ukazuje se však, že z použití inzulínové pumpy profitují zejména pacienti s vysokou GV, kteří pak dosahují také lepších hodnot HbA_{1c} (Pickup JS. et al., 2006). K významnému snížení GV u pacientů s DM 1. typu by mohlo přispět také používání kontinuální monitorace glykémie v reálném čase (RT-CGM) (El-Laboudi AH. et al., 2016). Kontinuální monitorace glykémie ukazuje pacientům aktuální glykémii, pomocí alarmů včas varuje při překročení stanoveného limitu a v neposlední řadě neustále analyzuje rychlost změny koncentrace glukózy v podkoží, kterou na displeji ukazují trendové šipky (pokles, vzestup, případně rychlý pokles nebo rychlý vzestup glukózy). Výhodné je spojení RT-CGM a inzulínové pumpy (SAP – Sensor Augmented Pump, senzor a pumpa), kdy se obě technologie účinně doplňují.

8. Kontinuální monitorace glukózy

Kontinuální monitorace glukózy (CGM) pomocí glykemických senzorů přináší nové a do značné míry revoluční možnosti ve snaze zlepšit kompenzaci pacientů s diabetem. Díky této nové technologii lze také podstatně lépe popsat, změřit a zkoumat glykemickou variabilitu.

Je známo, že dobrá kompenzace diabetu vede ke snížení výskytu a progresu diabetických komplikací. Na druhou stranu, při snaze o co nejtěsnější kompenzaci, narážíme často na hlavní limitaci léčby pacientů s diabetem – hypoglykémii. Optimální léčba diabetu by tedy měla vést k co nejlepší kompenzaci a současně nezvyšovat riziko hypoglykémie. V léčbě diabetu 2. typu se v posledních letech objevilo mnoho nových léků, které riziko hypoglykémie minimalizují. Naproti tomu, u pacientů diabetem 1. typu jsou hypoglykémie stále velmi častým a mnohdy obtížně řešitelným problémem. Navíc, více než 70% dospělých a více než 80% dětských pacientů s diabetem 1. typu nedosahuje cílových hodnot HbA_{1c}. V obou případech může pacientům výrazně pomoci CGM. Je prokázáno, že při trvalém použití CGM dochází ke snížení HbA_{1c} a snížení výskytu hypoglykémie (Bergenstal RM. et al., 2010; Battelino T. et al., 2012).

Kontinuální monitoraci lze s úspěchem použít v situacích, ve kterých glukometry běžně selhávají, a to i v případech, kdy si pacient měří glykémii velmi často. Ani časté měření pomocí glukometrů totiž nedokáže dostatečně postihnout trend vývoje glykémie během celého dne. To má za následek nedostatečný přehled o postprandiální glykémii a výskytu hypoglykemií v noci i během dne (obrázek 3).

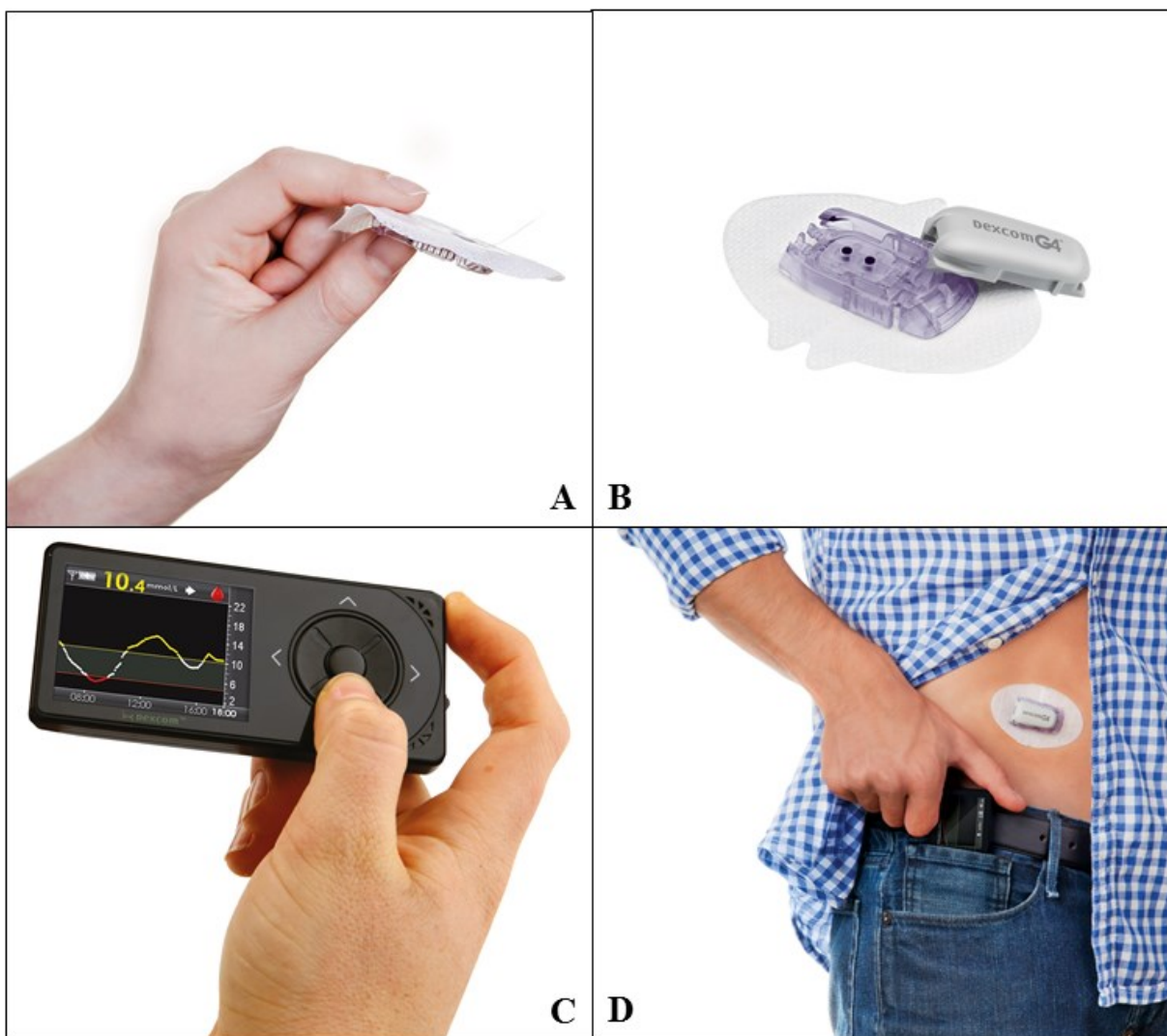


Obrázek č. 3: Limitace klasického selfmonitoringu glukometrem. A. Záznam z glukometru, který se zobrazí po stažení do počítače (program Diasend). Každý z černých bodů označuje jedno měření. B. Záznam z kontinuální monitorace glukózy. Každá z barevných linií odpovídá jednomu dni monitorace. CGM odhalila opakující se noční hypoglykémie (zaslepený záznam; systém iPro2, Medtronic).

8.1. Komponenty systémů pro kontinuální monitoraci glukózy

Základem systému pro CGM je **miniinvasivní senzor** (obrázek č. 4), který se zavádí do podkoží pomocí speciálního aplikátoru. Z fyzikálního hlediska je stanovení glukózy pomocí senzoru založeno nejčastěji na elektrochemickém principu (glukózo-oxidázová reakce).

Další komponentou systému je rekordér nebo vysílač (transmitter). **Rekordér** ukládá informace o naměřených hodnotách glukózy (zařízení pracující v tzv. zaslepeném režimu, podobně jako EKG Holter). **Vysílač** odesílá informace bezdrátově do **přijímače**. Jako přijímač mohou fungovat samostatná zařízení, některé inzulinové pumpy a nově u některých systémů také tzv. „chytré“ mobilní telefony.



Obrázek č. 4: Systém pro kontinuální monitoraci glukózy (Dexcom G4). **A.** Senzor; **B.** Senzor a vysílač; **C.** Přijímač; **D.** Celý systém pro kontinuální monitoraci po zavedení do podkoží.

Zdroj: <https://www.animascorp.co.uk/insulin-pumps/continuous-glucose-monitoring>.

<http://nzmsdiabetes.co.nz/item/dexcom-g4-platinum/>

8.2. Nastavení systémů pro kontinuální monitoraci glukózy

8.2.1. Zaslepené systémy pro kontinuální monitoraci (profesionální CGM)

Zaslepené systémy pracují na podobném principu jako „černá skříňka“ nebo holterovské monitorování EKG. Jde o retrospektivní metodu určenou pro profesionální nebo experimentální použití. Pacientovi je zaveden systém, který informace o změřených hodnotách glukózy ukládá do paměti. Záznamy se pak po ukončení monitorace (obvykle za 6-7 dní) a stažení do počítače vizualizují prostřednictvím příslušného programu. I při monitoraci v zaslepeném módu přetrvává nutnost kalibrace CGM. V případě systému iPro2 (Medtronic, USA) je kalibrace prováděna *ex post* po ukončení monitorace a stažení dat z CGM a glukometru do počítače nebo po ručním vložení dat z glukometru do databáze. Systém Dexcom se kalibruje bezprostředně po změření glykémie a jejím zadání do přijímače. Při monitoraci v zaslepeném módu nemocný informace o glykémii nevidí a nemá tedy bezprostředně možnost ovlivňovat výsledky monitorace. Proto je tento systém určen především pro zdravotníky/profesionální použití a jeho cílem je např. ověřit stav kompenzace diabetu před změnou terapie (například k odhalení nepoznaných hypoglykemií – obrázek 3) nebo hodnotit efekt po změně léčby. Toto nastavení systémů je také často využíváno při výzkumu. Zaslepený záznam tedy slouží především ke krátkodobé monitoraci glukózy.

8.2.2. Monitorace v „reálném“ čase (Real-Time CGM, otevřený záznam)

Poskytuje informaci o aktuální glykémii, graficky zobrazuje vývoj glykémie v čase a umožňuje predikci dalšího vývoje glykémie a jeho vizualizaci pomocí tzv. trendových šipek. Při překročení hraničních, předem nastavených hodnot glykémie nebo rychlosti její změny mohou systémy pro CGM pacienta varovat pomocí alarmů. Tyto funkce přispívají k prevenci hypoglykemií a hyperglykemií. Systémy pro monitoraci v reálném čase, jsou dodávány buď samostatně (systém Dexcom G4, který by měl být postupně doplňován novější generací Dexcom G5 a systémem Guardian Connect Mobile) nebo mohou být součástí inzulinové

pumpy (MiniMed 640G nebo Paradigm Veo se senzorem Enlite a Animas Vibe se senzorem Dexcom G4). U pacientů, kteří používají delší dobu CGM se zobrazením koncentrace glukózy v „reálném čase“, dochází ke snížení hladiny HbA_{1c} (JDRF-CGM trial. 2010; Bergenstal RM. et al., 2010; Battelino T. et al., 2012) a současně ke snížení výskytu hypoglykemií (Battelino T. et al., 2012). Navíc se ukazuje, že RT-CGM může být účinným nástrojem při snižování GV (Garg SK. et al., 2004; El-Laboudi AH. et al., 2016). Snížení lability glykemií je přitom u řady pacientů základním předpokladem k postupnému zlepšení kompenzace diabetu. Navíc, jak již bylo uvedeno, je možné, že GV nepředstavuje pouze akutní problém, ale že může mít význam i pro dlouhodobou prognózu pacientů (možný vztah ke vzniku a rozvoji makro- i mikrovaskulárních komplikací). Opakovaně bylo potvrzeno, že zlepšení kompenzace úzce souvisí s frekvencí používání RT-CGM a že dobrých výsledků dosahují v průměru ti pacienti, kteří používají CGM po více než 70 % času, a výborných výsledků ti, kteří jsou na CGM trvale - tj. takřka 100 % času (JDRF-CGM trial. 2010; Bergenstal RM. et al., 2010; Battelino T. et al., 2012).

8.3. Indikace pro kontinuální monitoraci glukózy

CGM má místo zejména tam, kde často dochází k náhlým změnám glykémie. Jeho použití je výhodné především u pacientů s hypoglykemiemi. Nejdůležitější indikace CGM jsou uvedeny v tabulce 3. CGM je na jedné straně indikována u motivovaných a spolupracujících pacientů, na straně druhé může pomoci edukovat a motivovat i pacienty nespolupracující. Při indikaci CGM v reálném čase, je nutné nejprve pacientovi přístroj důkladně představit a ujistit se, že zvládá jeho ovládání. Při prvním provedení RT-CGM u pacienta se doporučuje nastavit alarmy velmi benevolentně a obvykle doporučujeme, aby pacient první 2-3 dny neměnil svůj běžný režim podle informací které mu poskytuje RT-CGM.

Hypoglykémie
<ul style="list-style-type: none"> • noční hypoglykémie • nerozpoznané hypoglykémie • časté hypoglykémie • obava z hypoglykemií
Hyperglykémie
<ul style="list-style-type: none"> • trvale dekompenzovaný diabetes • postprandiální hyperglykémie • dawn fenomén (fenomén svítání), dark fenomén (fenomén soumraku) • posthypoglykemické hyperglykémie
Další indikace
<ul style="list-style-type: none"> • diskrepance mezi HbA_{1c} a hodnotami zjištěnými při selfmonitoringu • úpravy režimů (sport, onemocnění) • před nastavením inzulínové pumpy / k úpravám na již nastavené pumpy • prekoncepční péče a těhotenství • vysoká glykemická variabilita • gastroparézy
Alternativní indikace mimo diabetologii
<ul style="list-style-type: none"> • nediabetická hypoglykémie - inzulinom aj. • hyperglykémie kriticky nemocných pacientů

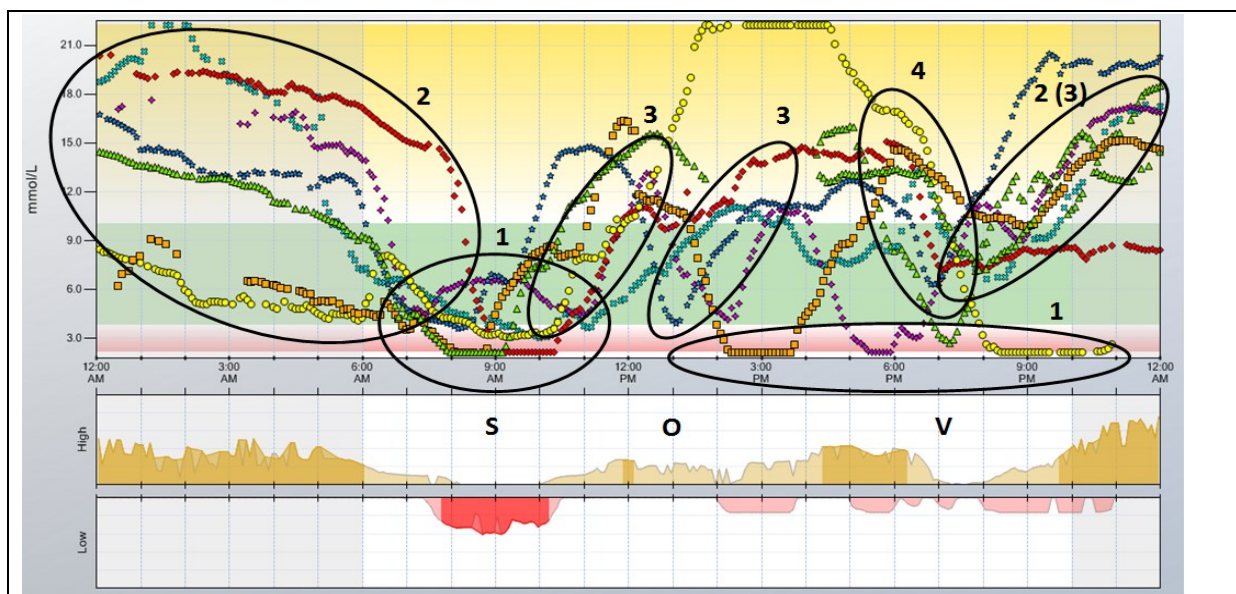
Tabulka č. 3. Indikace ke kontinuální monitoraci glukózy.

8.4. Proces kontinuální monitorace glukózy

Proces kontinuální monitorace glukózy lze schematicky rozdělit do 4 kroků:

1. zahájení monitorace (zavedení a iniciace systému, edukace pacienta o způsobech použití systému),
2. proces vlastní monitorace (záznam vedlejších důležitých dat – dávky inzulínu, množství sacharidů, fyzická aktivita apod.),
3. ukončení monitorace (vyjmutí senzoru, stažení dat počítače),
4. zhodnocení záznamu CGM.

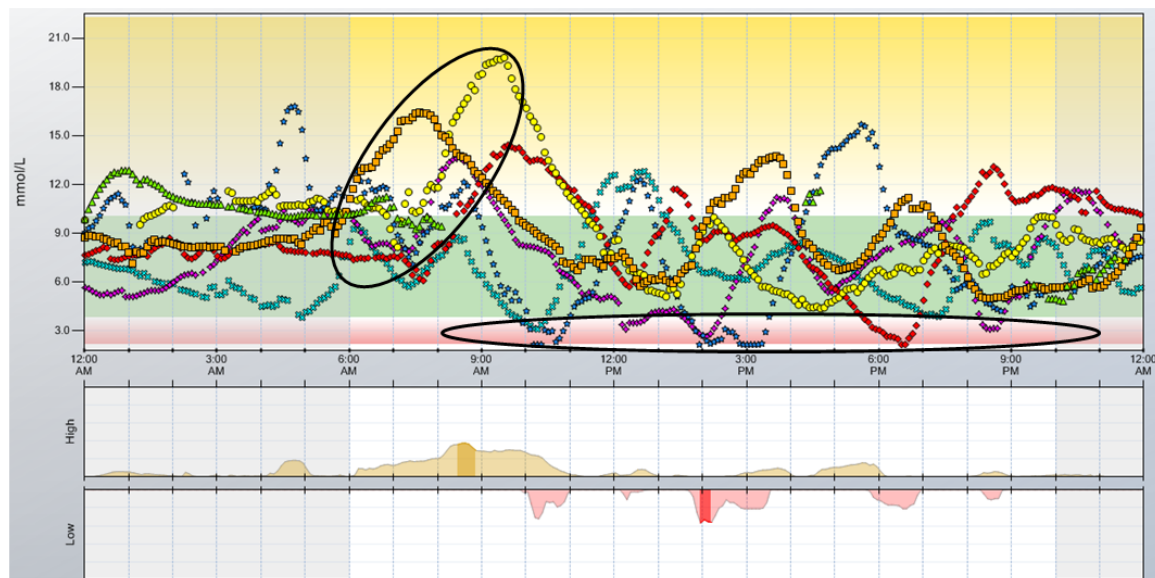
Při hodnocení záznamu CGM lze využít tzv. pětibodovou analýzu (obrázek 5), která nám zjednoduší orientaci i v méně přehledných záznamech. Základním pravidlem při hodnocení je hledání určitých opakujících se glykemických vzorců – pravidelně se opakujících událostí v glykemických trendech. Nejprve hledáme hypoglykémie, poté hodnotíme průběh glykémie v noci a večer, dále hledáme problémy po jídle a změny glykémie spojené s fyzickou aktivitou. Posledním krokem je zhodnocení efektu provedených změn. Získáme tak důležitou zpětnou vazbu, která nám umožňuje optimalizovat další postup a vést pacienta při léčbě.



Záznam v zaslepeném módu před změnou léčby.

S- snídaně, O – oběd, V – večeře.

1. Hypoglykémie: ANO (pravidelně zejména kolem 9:00 hod). **2.** Glykémie v noci a večer: hyperglykémie (v noci sestupný trend, večer trend vzestupný). **3.** Pre- a postprandiální glykémie: zejména postprandiální hyperglykémie. **4.** Fyzická aktivita: po 18 hodině pravidelně vycházka, trend sestupný, někdy doprovázený hypoglykemií. **Závěr:** těžké protrahované hypoglykémie, posthypoglykemické hyperglykémie, vysoká GV.



Záznam v „reálném čase“ po změně terapie

5. Kritické zhodnocení efektu provedených změn: snížení výskytu hypoglykemií a hyperglykemií, hypoglykémie mají kratší trvání, snížení GV, nově se ukázala výraznější postprandiální hyperglykémie po snídani.

Obrázek č. 5. Příklad hodnocení záznamu CGM („pětibodová analýza“). Dexcom Studio.

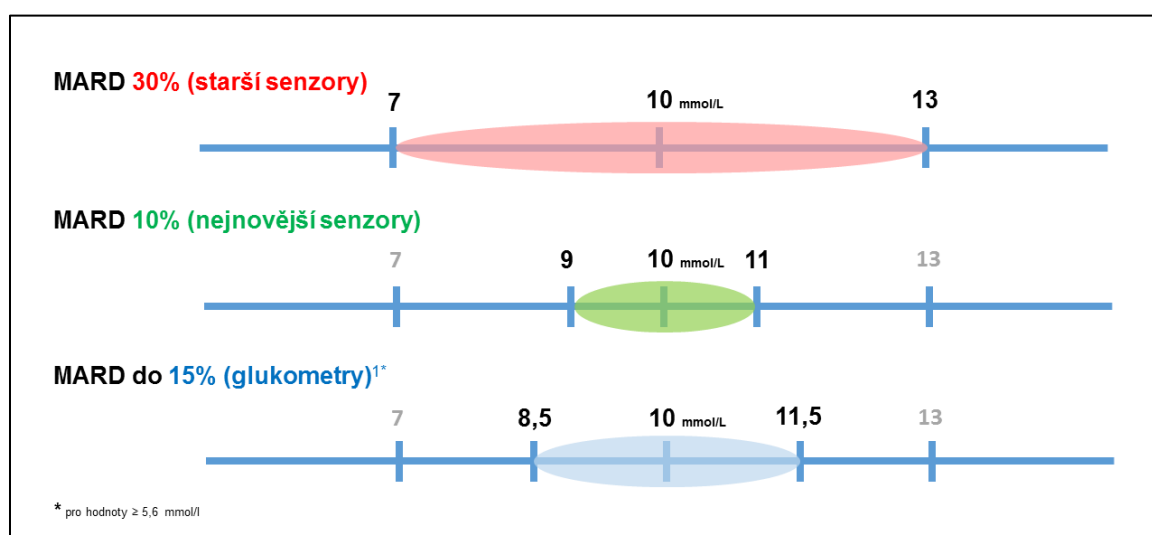
8.5. Pozice kontinuální monitorace v selfmonitoringu diabetu

Ze studie SWITCH (Battelino T. et al., 2012) víme, že přidání CGM k inzulinové pumpě vede ke zlepšení kompenzace a naopak, po odebrání CGM se kompenzace pacientů rychle zhoršuje, a to i přes to, že si pacienti velmi pravidelně měří glykemií s frekvencí více než pěti měření za den. Znamená to, že efekt na zlepšení kompenzace není trvalý a že CGM není možné plnohodnotně nahradit glukometrem.

Přestože se vžil název „kontinuální monitorace glykémie“, současné systémy poskytují výsledek měření intermitentně v určitých intervalech (obvykle zcela postačujících každých pět minut) a zároveň stanovují koncentraci glukózy v intersticiální tekutině, nikoli v krvi. Pokud však dochází k rychlým změnám glykémie, může se koncentrace glukózy v podkoží od glykémie (koncentrace glukózy v krvi) lišit. Tento časový posun označujeme jako tzv. lag-time (obvykle 5–12 minut). I když je koncentrace glukózy měřena senzorem v intersticiální tekutině a nemusí být nutně shodná s koncentrací glukózy v krvi, snahou výrobců systémů CGM je, aby byly mezi výsledky CGM a skutečnou glykemií co nejmenší rozdíly. Nejnovější systémy CGM jsou po této stránce velmi přesné a ve většině případů umožňují pacientovi i lékařům uvažovat o hodnotách udávaných systémem CGM jako o glykémii. Neznamená to ale, že je CGM zcela nezávislá na glukometrech. Všechny současné systémy CGM musí být kalibrovány pomocí hodnot zjištěných glukometrem (nejméně 2× denně). Určitou výjimkou je nový systém FreeStyle Libre (Abbott), který kalibraci nevyžaduje (Rodbard D., 2016; Bailey T. et al., 2015). Na druhou stranu systém FreeStyle Libre představuje technologii na pomezí mezi glukometry a CGM (tzv. FGM, flash glucose monitoring). Informaci o vývoji glykémie poskytuje teprve v okamžiku, kdy pacient přiloží speciální přijímač (nebo „chytrý“ telefon s operačním systémem Android a příslušnou aplikací) do blízkosti senzoru. Senzor může být používán 14 dní, je drobný a velmi přesný, ale nemá integrovanou funkci alarmů, jejichž přítomnost je pro řadu pacientů nezbytná. Tento systém je dostupný v několika zemích Evropy. Česká republika mezi ně prozatím nepatří.

Nižší přesnost starších typů senzorů ve srovnání s glukometry je hlavním důvodem, proč CGM nebyla doposud akceptována FDA jako plnohodnotná náhrada glukometrů. Pacienti, kteří používají většinu současných systémů pro CGM, by si tedy měli před každou aplikací inzulínu změřit glykémii glukometrem. Klinická praxe však ukazuje, že v řadě případů se pacienti spoléhají především na hodnoty ze senzoru a dodatečné ověření glukometrem rutinně

neprovádějí. Přesto dosahují dobrých výsledků. Důvodem je především stoupající přesnost současných systémů, která se v poslední době výrazně zlepšila (Rodbard D., 2016) a u některých systémů dosahuje přesnosti kvalitních glukometrů (Dexcom G4, Dexcom G5, FreeStyle Navigator, FreeStyle Libre). Paradoxně se tak stává, že aktuální hodnota zjištěná senzorem může být přesnější než hodnota stanovená glukometrem. V dohledné době by měla být v České republice dostupná 5. generace systému Dexcom (Dexcom G5) a systém Guardian Connect Mobile (Medtronic), v obou případech se výsledky, trendové šipky a jiná upozornění zobrazují na obrazovce mobilního telefonu (v obou případech kompatibilní s Apple iPhone). Odpadá tedy nutnost nošení přijímače, ale stále neodpadá nutnost kalibrace. Přesnost glukometrů i senzorů pro CGM se běžně vyjadřuje v procentech pomocí hodnoty MARD (mean absolute relative difference) (obrázek 6).



Obrázek č. 6: MARD: Grafické znázornění povoleného rozsahu nepřesnosti při teoretickém stanovení glykemie 10 mmol/l.

Uvádí se, že k tomu, aby pacienti mohli provádět bezpečná terapeutická rozhodnutí pouze na základě hodnot zjištěných senzorem, by se měla přesnost CGM vyjádřená pomocí hodnoty MARD, pohybovat pod hranicí 10% (Rodbard D., 2016). Pro srovnání, v České republice platí od roku 2014 poměrně přísná pravidla pro glukometry (Prázný M., 2013), která pracují s hodnotou MARD do 15 % (pro hodnoty $\geq 5,6$ mmol/l). U nového systému Dexcom G5 uvádí výrobce hodnotu MARD 9 % (Rodbard D., 2016). Jedná se o první schválený systém pro CGM, který pacientům umožňuje provádět běžná terapeutická rozhodnutí bez automatické nutnosti ověřování výsledků glukometrem – tzv. nonadjuvantní použití CGM (Rodbard D., 2016).

9. Vědecká hypotéza a cíle práce

9.1. Vědecká hypotéza

„Zvýšená glykemická variabilita se uplatňuje v patofyziologii komplikací DM 1. typu. K prokázání této souvislosti je nutné její stanovení pomocí kontinuální monitorace glukózy.“

9.2. Cíle práce

Víme, že HbA_{1c} nevyjadřuje dostatečně komplexně riziko komplikací DM. Z vědecké hypotézy vyplývá, že dalším možným faktorem, který přispívá k rozvoji komplikací, by mohla být zvýšená GV. Proto základním cílem této dizertační práce bylo studium vztahu mikrovaskulárních komplikací DM 1. typu a krátkodobé GV.

GV může být vypočítána buď z běžného glykemického profilu získaného měřením pomocí glukometrů a/nebo z dat získaných pomocí kontinuální monitorace glukózy v podkoží. Měření glukometrem několikrát denně ale nedokáže postihnout všechny výkyvy glykémie. Navíc, většina doposud provedených studií zabývajících se touto problematikou, vycházela při výpočtu GV právě z klasické monitorace glukometrem. Z tohoto důvodu bylo dalším cílem zpřesnit výpočet GV pomocí kontinuální monitorace glukózy a ověřit, zda toto zpřesnění výpočtu povede k odhalení souvislostí mezi GV a komplikacemi DM.

K hodnocení GV je možno použít několik metod, ale prozatím není žádná akceptována jako univerzální. Proto dalším cílem byla snaha o určení této metody.

Při základním výzkumu GV na tkáňových kulturách je zvýšená GV a setrvalá hyperglykémie často simulována způsobem, který je odlišný od skutečných podmínek lidského organismu. Proto jedním z cílů této dizertační práce bylo vytvořit klinicky relevantní *in vitro* experimentální model pro výzkum GV, který by co nejlépe odrážel reálnou GV pozorovanou u skutečných pacientů s DM 1. typu i zdravých jedinců a zkoumat, nakolik vysoká a nízká

GV ovlivňuje expresi genů, jejichž produkty mohou hrát důležitou úlohu v patofyziologii komplikací DM.

Zvýšená GV je spojena se zvýšeným rizikem hypoglykémie, je překážkou k uspokojivé kompenzaci a možná se podílí na vzniku chronických komplikací DM. Z těchto důvodů je důležité pokusit se vysokou GV snížit. Proto dalším cílem této práce bylo ověřit, zda je možné GV snížit dlouhodobým používáním kontinuální monitorace v reálném čase a porovnat výsledky této léčby s jinými přístupy uplatňujícími se v léčbě DM 1. typu.

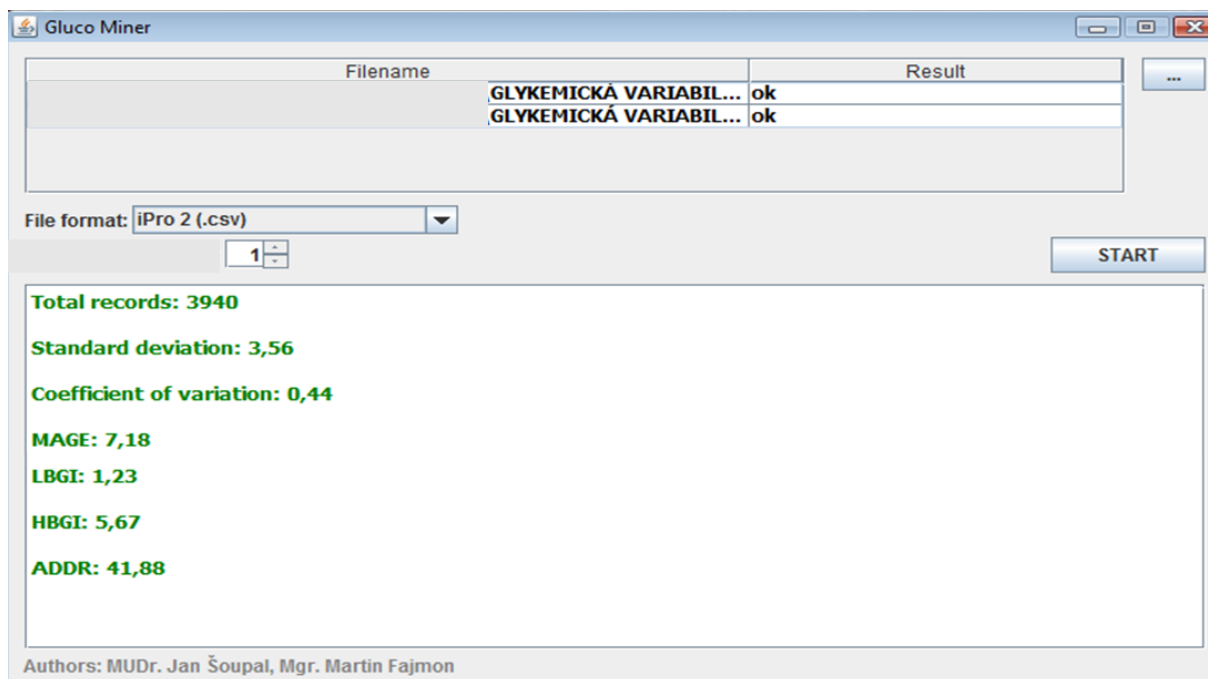
10. Metodika

10.1. Výpočet glykemické variability

Podrobný popis metod, kterými je možné hodnotit GV je uvedený v obecné části. V naší práci byla použita celková směrodatná odchylka (SD_T), variační koeficient (CV) a parametr MAGE (Mean Amplitude of Glycemic Excursions). Parametry GV byly vypočítány z běžného selfmonitoringu glykemií prováděného glukometry a především z dat získaných pomocí CGM. Informace z CGM byly nejprve staženy do originálních programů výrobců pro kontinuální monitoraci, které slouží ke klinickému hodnocení. K výpočtu GV bylo nutné data dále exportovat (obrázek 7). Exportem je získáno velké množství nesourodých dat, která jsou náročná na filtrování a také samotné vzorce GV jsou poměrně složité (tabulka 1), proto byl vytvořen vlastní program, který umožňuje vypočítat zvolené parametry GV (obrázek 8).

	C	D	E	F	G	H													
1	Patient ID	Monitor ID	Sample #	Day	Date	Time	SIG	VCTR	Meter BG	Paired Meter BG	Slope	Offset	Valid	ISIG	Sens				
2	11060991-2	11	Mon	07-Feb-11	15:19	19.33	-0.58		mmol/L	EPU		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
3	11060991-2	12	Mon	07-Feb-11	15:24	16.11	-0.58		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
4	11060991-2	13	Mon	07-Feb-11	15:34	0.00	-0.58		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
5	11060991-2	14	Mon	07-Feb-11	15:39	0.19	-0.48		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
6	11060991-2	15	Mon	07-Feb-11	15:44	0.40	-0.53		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
7	11060991-2	16	Mon	07-Feb-11	15:49	71.82	-0.63		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
8	11060991-2	17	Mon	07-Feb-11	15:59	0.00	-0.48		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
9	11060991-2	18	Mon	07-Feb-11	16:35	12.90	-0.48		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
10	11060991-2	19	Mon	07-Feb-11	16:40	10.86	-0.48		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
11	11060991-2	20	Mon	07-Feb-11	16:45	0.43	-0.58		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
12	11060991-2	21	Mon	07-Feb-11	16:50	67.85	-0.68		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
13	11060991-2	22	Mon	07-Feb-11	16:55	0.00	-1.48		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
14	11060991-2	23	Mon	07-Feb-11	17:00	0.00	-0.58		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
15	11060991-2	24	Mon	07-Feb-11	17:05	4.01	-0.48		mmol/L		SROR		Noise		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A		
16	11060991-2	25	Mon	07-Feb-11	17:10	6.91	-0.48		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
17	11060991-2	26	Mon	07-Feb-11	17:15	9.01	-0.48		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
18	11060991-2	27	Mon	07-Feb-11	17:20	9.59	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
19	11060991-2	28	Mon	07-Feb-11	17:25	9.39	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
20	11060991-2	29	Mon	07-Feb-11	17:30	9.12	-0.53		mmol/L		ES		2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A				
21	11060991-2	30	Mon	07-Feb-11	17:35	9.27	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
22	11060991-2	31	Mon	07-Feb-11	17:40	9.60	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
23	11060991-2	32	Mon	07-Feb-11	17:45	9.88	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
24	11060991-2	33	Mon	07-Feb-11	17:50	10.55	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
25	11060991-2	34	Mon	07-Feb-11	17:55	10.93	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
26	11060991-2	35	Mon	07-Feb-11	18:00	11.14	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
27	11060991-2	36	Mon	07-Feb-11	18:05	11.63	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
28	11060991-2	37	Mon	07-Feb-11	18:10	12.19	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
29	11060991-2	38	Mon	07-Feb-11	18:15	12.58	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
30	11060991-2	39	Mon	07-Feb-11	18:20	12.05	-0.53		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
31	11060991-2	40	Mon	07-Feb-11	18:25	11.68	-0.48		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					
32	11060991-2	41	Mon	07-Feb-11	18:30	11.49	-0.48		mmol/L			2.0A	14-Feb-11	CGMS iPro 2.0A					

Obrázek č. 7: „Nativní“ soubor získaný exportem dat z originálního programu pro analýzu záznamů z kontinuální monitorace (Program CareLink™ iPro).



Obrázek č. 8: Vlastní software vyvinutý pro výpočet parametrů glykemické GV (GlucoMiner).

10.2. Přístroje pro kontinuální monitoraci a glukometry

Pacienti byli monitorováni pomocí různých přístrojů pro CGM, které byly používány v zaslepeném módu (profesionální kontinuální monitorace) i v otevřeném nastavení (monitorace v reálném čase). Pro profesionální kontinuální monitoraci byl používán systém iPro2TM (Medtronic, Northridge, CA) a Dexcom 7 Plus (Dexcom, San Diego, CA). K monitoraci v reálném čase byl použit systém MiniMed Paradigm VeoTM se senzorem Enlite (Medtronic, Northridge, CA) a senzor DexCom G4 (Dexcom, San Diego, CA) v kombinaci s inzulinovou pumpou Animas Vibe nebo samostatně. Popis principů kontinuální monitorace je uvedený v obecné části této disertační práce.

Hodnota glykémie, nutná především pro výpočet GV z klasického selfmonitoringu a ke kalibraci systémů pro CGM, byla stanovena pomocí osobních glukometrů Accu-ChekTM (Roche, Basel, Switzerland) nebo One-TouchTM (LifeScan, Milpitas, CA).

10.3. Hodnocení přítomnosti mikrovaskulárních komplikací

Přítomnost diabetické retinopatie byla hodnocena oftalmologem pomocí nepřímé oftalmoskopie v arteficiální mydriáze. Mikroalbuminurie, použitá jako marker diabetické nefropatie, byla měřena jako poměr albumin/kreatinin (ACR) ve vzorku sbírané moči. Hodnoty ACR vyšší než 2,5 g/mol u mužů a 3,5 g/mol u žen byly hodnoceny jako pozitivní. Přítomnost distální senzomotorické neuropatie byla hodnocena neinvazivně, určením prahu vibračního cití (VPT - vibration perception threshold) bioteziometrem (Bio-Medical Instrument Co, Newbury, OH) (obr. 9). Při vyšetření bylo postupováno podle metodologie schválené Americkou diabetickou asociací (ADA) a Americkou asociací klinických endokrinologů (AACE) (Boulton AJ. et al. 2008). Před vyšetření je pacient informován o principech metody a o vjemech, které může během vyšetření očekávat, vyšetření probíhá v klidné místnosti, pacient při něm leží na zádech. Elektroda bioteriometru se přikládá ve vertikální poloze na dorzální stranu metatarzu palce vyšetřované dolní končetiny, postupně je zvyšována amplituda vibrací dokud pacient vibrace neucítí. Tento proces se opakuje třikrát, střídavě na obou dolních končetinách a výsledek je určen pro každou končetinu samostatně, průměrem ze třech měření. Hodnoty VPT < 15 V jsou považovány za normální, od hodnot více jak 15 V hovoříme o porušeném prahu vibračního cití a hodnoty přesahující 25 V jsou klasifikovány jako abnormální, značí přítomnost senzorické neuropatie.



Obrázek 9: Bioteziometr (Bio-Medical Instrument Co, Newbury, OH)

Podrobný popis výběru pacientů, statistického zpracování a další metodologické podrobnosti jsou popsány v příložených publikacích v následující kapitole.

11. Vlastní výsledky výzkumné práce

11.1. Glykemická variabilita je vyšší u pacientů s diabetem 1. typu a mikrovaskulárními komplikacemi

Cíl práce: Zvýšená glykemická variabilita (GV) se u diabetu může podílet na rozvoji mikrovaskulárních komplikací (MVK). Porovnali jsme proto GV vypočítanou z kontinuální monitorace glykémie s přítomností MVK u pacientů s diabetem 1. typu.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 32 pacientů, z toho 16 s přítomnými komplikacemi. K určení přítomnosti MVK bylo provedeno vyšetření očního pozadí v arteficiální mydriáze, ve vzorku sbírané moči byla stanovena mikroalbuminurie a pomocí bioteziometru byl určen práh vibračního cití. K výpočtu GV byla použita data z kontinuální monitorace glykémie (CGM) prováděné po dobu dvou týdnů v zaslepeném módu. Pomocí vlastního programu jsme vypočítali celkovou směrodatnou odchylku (SD_T), variační koeficient (CV) a parametr MAGE.

Výsledky: Pacienti s jakoukoliv MVK měli signifikantně vyšší GV vypočítanou z CGM, než pacienti bez komplikací (SD_T : $4,1 \pm 0,6$ vs. $3,4 \pm 0,8$ mmol/L [$p=0,010$]; CV: $0,43 \pm 0,06$ vs. $0,38 \pm 0,08$ [$p=0,032$]; MAGE: $6,9 \pm 1,2$ vs. $5,9 \pm 1,2$ mmol/L [$p=0,014$]). Obě skupiny se přitom nelišily v hladině glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c} : 70 ± 9 vs. 69 ± 10 mmol/mol, NS). Naopak nebyly prokázány signifikantní rozdíly v GV vypočítané z klasického selfmonitoringu prováděného pouze pomocí glukometrů (SMBG).

Závěr: GV vypočítaná z kontinuální monitorace glykémie, ale nikoliv z klasického SMBG, byla signifikantně vyšší u pacientů s diabetem 1. typu a přítomnými komplikacemi, přestože tyto pacienti měli podobné hodnoty HbA_{1c} jako pacienti bez komplikací. Tento výsledek podporuje hypotézu, že vyšší GV může souviset s rozvojem MVK u pacientů s diabetem 1. typu a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace diabetu. Příčinnou souvislost ovšem na základě naší práce potvrdit nemůžeme.

Článek byl publikován v časopise *Diabetes Technology and Therapeutics*, IF=2,198. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

11.2. Kontinuální monitorace glukózy zlepšuje kompenzaci pacientů s diabetem 1. typu v průběhu 52 týdnů léčby inzulinovou pumpou i klasickým režimem bazál-bolus: „COMISAIR study“

Cíl práce: Léčba inzulinovou pumpou (CSII) zlepšuje kompenzaci diabetu jak samostatně, tak v kombinaci s kontinuální monitorací glykémie (CGM). Nedostatečně je zmapována účinnost dlouhodobého užívání CGM u pacientů na inzulinových perech (MDI - Multiple Daily Injections). Cílem studie bylo porovnat vliv dlouhodobé CGM na parametry kompenzace diabetu, včetně glykemické variability (GV), u pacientů léčených CSII a inzulinovými pery ve srovnání s běžnými režimy založenými na klasickém selfmonitoringu.

Metodika: V této prospektivní studii bylo sledováno po dobu 1 roku 65 pacientů s DM 1. typu. Pacienti byli rozděleni do 4 skupin se srovnatelnými vstupními parametry. 27 pacientů zahájilo používání CGM, z toho 15 v kombinaci s pumpou (SAP - Sensor Augmented Pump) a zbývajících 12 zůstalo na léčbě pery (MDI+CGM). Dále bylo sledováno 20 pacientů po zahájení léčby CSII a 18 pacientů pouze na MDI. Na začátku studie byla u všech pacientů provedena zaslepená CGM. Hlavními sledovanými parametry byly HbA_{1c}, GV vyjádřená směrodatnou odchylkou glykémie (SD_T) a výskyt hypoglykémie.

Výsledky: Po roce došlo ve skupině pacientů na CGM k významnému poklesu HbA_{1c} (67,5±10,4 vs. 54,5±9,1 mmol/M; p<0,0001), přitom obě podskupiny pacientů na SAP i MDI+CGM vykazovaly srovnatelné zlepšení HbA_{1c}. Ke snížení HbA_{1c} vedla také samotná léčba pumpou bez CGM (68,3±9 vs. 62,7±8 mmol/M; p<0,05), naopak ve skupině pouze na perech nebyl dosažen signifikantní pokles HbA_{1c}. K významnějšímu poklesu HbA_{1c} došlo u pacientů s CGM ve srovnání s léčbou pumpou samotnou (54,5±9,1 vs. 62,7±8 mmol/M; p=0,0032). Ke snížení GV vedlo použití CGM (SD_T: 4,0±0,7 vs. 3,0±0,5; p<0,0001) i léčba pumpou bez CGM (SD_T: 3,9±0,6 vs. 3,4±0,6; p<0,01). Ke snížení času stráveného v hypoglykémii došlo pouze u pacientů na CGM (8±4 vs. 6±3%; p<0,01).

Závěr: Používání CGM vede k významnému zlepšení HbA_{1c}, GV a času stráveného v hypoglykémii jak u pacientů léčených inzulinovou pumpou, tak i u pacientů na inzulinových perech. Toto zlepšení je významnější než při použití samotné inzulinové pumpy. Kombinace senzoru s inzulinovými pery může být pro řadu pacientů vhodnou alternativou k režimu SAP.

Článek byl publikován v časopise Diabetes Technology and Therapeutics, IF=2,198. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

11.3. Vliv glykemické variability na patofyziologické dráhy spojené s glukotoxicitou: Zhodnocení nového *in vitro* modelu.

Cíl práce: Podle některých studií je zvýšená glykemická variabilita (GV) spojena s vyšším rizikem vzniku komplikací diabetu. Doposud provedené patofyziologické studie hodnotící vliv GV na buněčné kultury ukázaly, že zvýšená GV vede k významnějšímu poškození zkoumaných buněk než setrvalá hyperglykémie. Metodika použitá k výzkumu GV *in vitro* se však v jednotlivých studiích výrazně liší a především nedostatečně odráží stav *in vivo*. Cílem této práce proto bylo vytvořit klinicky relevantní *in vitro* experimentální model pro výzkum GV, který by co nejlépe odrážel reálnou GV pozorovanou u skutečných pacientů s DM 1. typu i zdravých jedinců a zkoumat, nakolik vysoká a nízká GV ovlivňuje expresi genů podílejících se na ochraně buněk před poškozením vyvolaným hyperglykemií.

Metodika: V této práci byly použity lidské endoteliální buňky z pupečnickové žíly, která byly po dobu 24 hodin vystaveny médiu s měnící se koncentrací glukózy simulující rozdílné glykemické profily – vysokou GV, nízkou GV a GV zdravých jedinců. Tyto profily byly vytvořeny podle záznamů z kontinuální monitorace skutečných pacientů s DM 1. typu a zdravých dobrovolníků. Zkoumané profily byly navíc porovnávány s běžně užívanými médii o koncentraci glukózy 5,5 a 25 mmol/L. Genová exprese byla stanovena pomocí kvantitativní PCR v reálném čase.

Výsledky: V porovnání s normálními koncentracemi glukózy vedlo vystavení buněk účinkům nízké a vysoké GV ke snížení exprese genů, jejichž produktem jsou enzymy, působící intracelulárně protektivně při hyperglykémii. Naopak, v expresi zkoumaných genů nebyly pozorovány rozdíly mezi nízkou a vysokou GV.

Závěr: Výsledky této studie ukazují, že zvýšená GV může mít, v porovnání se setrvalou hyperglykemií, obdobný nebo dokonce významnější vliv na expresi řady genů, které hrají důležitou úlohu v patofyziologii komplikací diabetu.

Článek byl publikován v časopise Diabetes Research and Clinical Practice, IF=3,045. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

11.4. Glykemická variabilita, glykovaný hemoglobin a mikrovaskulární komplikace

Cílem tohoto článku bylo podat aktuální přehled dosavadních poznatků o možné souvislosti glykemické variability s komplikacemi diabetu, se zvláštním zřetelem na komplikace mikrovaskulární. Cévní komplikace diabetu vznikají následkem dlouhodobě neuspokojivé kompenzace DM. Kompenzaci diabetu obvykle hodnotíme podle hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}). HbA_{1c} však nevypovídá o krátkodobém kolísání glykémie. V poslední době máme díky kontinuální monitoraci glykémie možnost GV podrobně hodnotit. V souvislosti s výzkumem krátkodobé GV je nyní více zkoumáno i dlouhodobé kolísání kompenzace diabetu hodnocené pomocí variability HbA_{1c} . GV může mít vztah k oxidačnímu stresu, endotelové dysfunkci a zánětu, což jsou faktory, které jsou tradičně spojovány s cévním poškozením. V několika studiích byl popsán vztah GV k makrovaskulárním komplikacím diabetu, nicméně vztah k mikrovaskulárním komplikacím zůstává nejasný. Tento přehledný článek shrnuje nedávné poznatky o GV a jejím možném vztahu k retinopatii, nefropatii a neuropatii.

Článek byl publikován v časopise *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, IF=5,088. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

11.5. Kožní autofluorescence u diabetu souvisí se solubilními receptory pro konečné produkty glykace a albuminurií

Cíl práce: Cílem této práce bylo porovnat změny v kožní autofluorescenci, která je způsobená akumulací konečných produktů pokročilé glykace (advanced glycation end-products – AGEs), s biochemickými markery endotelové dysfunkce a koncentrací solubilního receptoru pro AGEs (sRAGE).

Metodika: Do studie bylo zařazeno 88 pacientů s diabetem (47 s diabetem 1. typu a 41 s diabetem 2. typu) a 20 kontrolních osob. Pokročilá glykace byla hodnocena pomocí stanovení kožní autofluorescence (AGE-Reader, Diagnoptics) a vyjádřená v arbitrárních jednotkách (AU). Sérová koncentrace sRAGE byla stanovena pomocí metody ELISA.

Výsledky: Kožní autofluorescence byla signifikantně vyšší u pacientů s diabetem 1. i 2. typu v porovnání se zdravými kontrolami ($2,39 \pm 0,54$; $2,63 \pm 0,73$ versus $1,96 \pm 0,33$ AU; $P < 0,0001$). Pozitivní korelace mezi kožní autofluorescencí a koncentrací sRAGE byla pozorována u pacientů s diabetem 1. i 2. typu ($r = 0,37$, $p < 0,02$ a $r = 0,60$, $p < 0,0001$), ale nikoli u zdravých kontrol. Signifikantně vyšší hodnoty kožní autofluorescence byly nalezeny u pacientů s pozitivní albuminurií než u pacientů s normální albuminurií. Podobně byly vyšší hodnoty kožní autofluorescence zaznamenány u pacientů se známkami endotelové dysfunkce, která byla hodnocena pomocí molekul vWF, ICAM-1 a VCAM-1. Regresní analýzou byla u pacientů s diabetem zjištěna asociace kožní autofluorescence s věkem, koncentrací sRAGE a poměrem albumin-kreatinin ($r^2 = 0,38$).

Závěr: Studie potvrdila, že kožní autofluorescence je u pacientů s diabetem zvýšená. Tento výsledek byl nejvíce vyjádřen u pacientů s pozitivní albuminurií a u pacientů s endotelovou dysfunkcí. Významná korelace mezi kožní autofluorescencí a koncentrací sRAGE podporuje hypotézu, že kožní autofluorescence je modifikována interakcí konečných produktů pokročilé glykace s sRAGE. Přesný mechanismus zůstává zatím nejasný a bude předmětem dalšího výzkumu.

Článek byl publikován v časopise Journal of Diabetes Research, IF=1.89. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

11.6. Akutní hyperglykémie neovlivňuje mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u DM 1. typu v průběhu hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu.

Cíl práce: Zhodnotit vliv akutní hyperglykémie (hyperglykemické složky glykemické variability) na biochemické markery funkce endotelu a kožní mikrovaskulární reaktivitu (MVR) při izoglykemickém a hyperglykemickém hyperinzulinemickém clampu.

Metodika: 16 pacientů s DM 1. typu bez specifických komplikací DM podstoupilo hyperinzulinemický clampový test v izo- a hyperglykemické fázi. MVR byla měřena pomocí metody laser-doppler na horních končetinách a využity byly testy s post-okluzivní reaktivní hyperémií (PORH) a s termální hyperémií (TH). Z biochemických parametrů byla sledována hladina inzulinu, lipidů, cytoadhezivních molekul (ICAM-1 a VCAM) a fibrinogenu.

Výsledky: Ve srovnání s perfúzí na začátku testu došlo během hyperglykemické fáze clampu ke zvýšení maximální perfúze při PORH (40 ± 16 vs. 47 ± 16 PU, $p < 0,01$) a byl nalezen i rychlejší vzestup perfúze při PORH ($2,6 \pm 1,5$ vs. $10,4 \pm 16,5$ PU·s⁻¹, $p < 0,05$). Doba potřebná k dosažení maximální perfúze v průběhu testu s TH byla kratší a rychlost perfúze v průběhu testu s TH byla vyšší v hyperglykemické ve srovnání s izoglykemickou fází clampu (69 ± 15 vs. 77 ± 16 s, $P < 0,05$ a $1,4 \pm 0,8$ vs. $1,2 \pm 0,7$ PU·s⁻¹, $P < 0,05$). Při hodnocení perfúze v bohatě vaskularizované tkáni břicha prstu byl zjištěn inverzní vztah mezi koncentrací inzulinu a dobou nutnou k dosažení maximální perfúze při PORH v hyperglykemické fázi testu ($r = -0,70$, $p < 0,01$).

Závěr: V této studii nebyla potvrzena hypotéza, že rychlé zvýšení glykémie negativně ovlivní mikrovaskulární reaktivitu pacientů s DM 1. typu. Ke zvýšení několika parametrů MVR v došlo patrně díky vazodilatačnímu účinku inzulinu při jeho zvýšené koncentraci. Nalezli jsme souvislost mezi koncentrací fibrinogenu a MVR, což může svědčit o ovlivnění MVR hemokoagulačními parametry.

Článek byl publikován v časopise Experimental Diabetes Research, IF=1,528. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

12. Diskuze a závěr

12.1. Diskuze

Naše práce se zabývala novými biomarkery v diagnostice a terapii pozdních komplikací diabetu. Mezi tyto ukazatele je řazená také GV, na kterou se tato dizertační práce soustředila především. Za pomoci CGM jsme totiž v současné době schopni GV spolehlivě popsat, vypočítat, ale také snížit.

Ačkoliv u DM 2. typu přibývají v posledních letech důkazy o možné souvislosti mezi zvýšenou GV a mikro- i makrovaskulárními komplikacemi (Nalysnyk L. et al., 2010), podobné výsledky nebyly konzistentně pozorovány u DM 1. typu. Tento závěr je poměrně překvapivý, protože pacienti s DM 1. typu tvoří v porovnání s pacienty s DM 2. typu homogennější skupinu. Homogenitu zkoumané skupiny pacientů považujeme za velice důležitou, proto jsme se při výzkumu GV rozhodli soustředit právě na pacienty s DM 1. typu. Tito pacienti navíc obvykle netrpí v tak významné míře ostatními metabolickými chorobami, které jsou naopak velmi typické pro pacienty s DM 2. typu. Tento faktor mohl přispět ke zvýšení šance na prokázání případné souvislosti mezi mikrovaskulárními komplikacemi diabetu a GV.

V naší práci byla GV vypočítaná ze záznamu CGM signifikantně vyšší u pacientů s DM 1. typu a přítomnými mikrovaskulárními komplikacemi, přestože tito pacienti měli podobné hodnoty HbA_{1c} jako pacienti bez komplikací. Tento výsledek podporuje hypotézu, že vyšší GV může u DM 1. typu souviset s rozvojem mikrovaskulárních komplikací a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace diabetu.

Retrospektivní analýzy studie DCCT a jejího pokračování, studie EDIC, neprokázaly, na rozdíl od naší práce, signifikantní korelaci mezi GV a retinopatií, neuropatií nebo nefropatií (Siegelaar SE. et al., 2010). Z hlediska současného přístupu k analýze GV měla však studie DCCT/EDIC významné limitace. Tato studie nebyla nikdy primárně připravována na hodnocení GV, ale na porovnání intenzifikované a konvenční inzulinové léčby. Nejdůležitější limitací byl způsob výpočtu GV. Autoři k němu použili pouze 5-7 bodový profil glykémie, který byl měřen jen jednou za 3 měsíce. Výpočet GV z klasického glykemického profilu může ale být nepřesný (Siegelaar SE. et al., 2010), neboť k řadě poklesů a vzestupů glykémie dojde bez povšimnutí mezi měřeními glukometrem. Tomu napovídají i výsledky naší studie, ve

kteřé 4 bodový glykemický profil nedokázal odhalit souvislost GV s komplikacemi, ačkoliv GV vypočítaná ze záznamů CGM jasně tuto spojitost prokázala. Tento nále z je opět v souladu s ověřovanou hypotézou. Je důležité zdůraznit, že ačkoliv se řada studií zabývala problematikou GV, překvapivě málo pozornosti bylo věnováno zdrojovým datům, ze kterých byla GV vypočítávána. Počet měření se pohyboval v širokém rozpětí od 5-7 měření glykémie každé 3 měsíce ve studii DCCT (Siegelaa r SE. et al., 2009) přes 70 měření glykémie v průběhu 4 týdnů (Bragd J. et al., 2008) až k měření v 5 minutových intervalech pomocí CGM (Monnier L. et al., 2006). Studie zabývající se minimální frekvencí měření, ze kterých může být ještě GV spolehlivě vypočítávána, ukázala, že výpočet GV pomocí SD_T se stává nespolehlivý, pokud jsou jednotlivá měření od sebe vzdálená více jak 2-4 hodiny a že hodnota MAGE je nepřesná, pokud jsou jednotlivá měření vzdálená více než 1 hodinu (Baghurst PA. et al., 2010). Proto se domníváme, že by měla být CGM pro výpočet GV jednoznačně preferována.

K určení GV je možné využít celou řadu různě složitých výpočtů. Jedním z cílů této dizertační práce bylo určení vhodné metody k výpočtu GV. Výsledky naší práce ukazují, že jednotlivé parametry GV mezi sebou významně korelují a že komplexnější parametry nepřinášejí více informací, než poskytuje poměrně jednoduchý výpočet SD_T nebo CV. Na základě těchto výsledků se nedá definitivně uzavřít, že SD_T nebo CV jsou nejvhodnější parametry k výpočtu GV, ale s ohledem na jejich jednoduchý výpočet je lze bez větších překážek použít v rutinní péči o pacienty s diabetem i v experimentu.

Naše studie porovnávající GV u pacientů s komplikacemi a bez přítomných mikrovaskulárních komplikací nebyla prospektivní. V tom lze spatřovat její hlavní limitaci. Pouze velká mezinárodní prospektivní studie by dokázala definitivně odpovědět na otázku, zda GV zvyšuje riziko komplikací diabetu či nikoliv. Na druhou stranu, taková studie by vyžadovala zahrnout tisíce pacientů s krátkým trváním diabetu, kteří ještě nemohli rozvinout specifické komplikace. Pacienti by museli být sledováni mnoho let (Gubitosi-Klug RA., 2014). GV by musela být měřena po většinu času pomocí zaslepené CGM, protože SMBG nedokáže postihnout GV dostatečně komplexně. Je pravděpodobné, že se zlepšujícími se terapeutickými možnostmi by se v průběhu let GV pacientů zařazených v takové studii snižovala. Nutnost dlouhodobého používání zaslepené CGM by takovou studii činila velice nákladnou a pacientům by zhoršovala kvalitu života, protože by museli používat zařízení, z něhož by neměli bezprostřední benefit. Z těchto důvodů se patrně i v budoucnu budeme muset spoléhat na nepřímé důkazy z menších klinických a patofyziologických studií provedených například *in vitro* na buněčných kulturách.

Studie, které se doposud zabývaly vlivem GV na tkáňové kultury, většinou ukazují na významnější poškození buněk, které jsou vystavené zvýšené GV (Quagliaro L. et al., 2003, Piconi L. et al., 2006). Metodika použitá k výzkumu GV *in vitro* se však v jednotlivých studiích výrazně lišila a především nedostatečně odrážela stav *in vivo*. Proto jedním z dalších cílů práce bylo vytvořit a otestovat nový model pro výzkum GV *in vitro*, který lépe odráží reálnou GV pozorovanou u skutečných pacientů. Poprvé byly k takovému výzkumu na tkáňových kulturách použity glykemické profily vytvořené podle záznamů CGM pacientů s DM 1. typu a zdravých dobrovolníků. Výsledky ukazují, že zvýšená GV odpovídající GV skutečných pacientů s DM 1. typu může mít v porovnání se setrvalou hyperglykemií podobný nebo dokonce významnější vliv na expresi některých genů, které hrají důležitou úlohu v patofyziologii komplikací diabetu. Zvýšená GV je spojena se zvýšeným výskytem hypoglykemií a je pravděpodobné, že se podílí i na rozvoji pozdních komplikací diabetu. Navíc negativně ovlivňuje kvalitu života a psychickou pohodu pacienta a představuje významnou bariéru při snaze zlepšit kompenzaci diabetu. Z těchto důvodů je v klinické praxi důležité pokusit se GV u pacientů s diabetem snížit. Je prokázáno, že zvýšená GV může být u pacientů s DM 1. typu snížena použitím dlouhodobě působících inzulínových analog (White NH. et al., 2009), inzulínové pumpy (Pickup JC. et al., 2006, Bruttomesso D. et al., 2008) a pravděpodobně také používáním CGM v reálném čase (El-Laboudi AH. et al., 2016). Není ovšem jasné, který z těchto postupů je z hlediska snížení GV nejefektivnější, protože tyto přístupy nebyly současně porovnávány ve stejné prospektivní studii.

Proto dalším cílem této práce bylo porovnat vliv RT-CGM na parametry kompenzace diabetu, včetně GV, u pacientů s DM 1. typu léčených inzulínovou pumpou nebo inzulínovými perami ve srovnání s režimy založenými na klasickém SMBG. Naše studie ukázala, že dlouhodobé používání RT-CGM vede k významnému snížení GV, HbA_{1c} a času stráveného v hypoglykémii. Obě podskupiny pacientů používající RT-CGM (pacienti na pumpě i pacienti na perách) vykazovaly srovnatelné zlepšení. Důležité je, že snížení GV i ostatních sledovaných parametrů u pacientů s RT-CGM bylo významnější než při použití samotné inzulínové pumpy nebo inzulínových per. Naše studie byla první prospektivní studií s délkou trvání jeden rok, která u pacientů s DM 1. typu současně porovnávala čtyři strategie léčby založené na rozdílné kombinaci podávání inzulínu a monitorace glykémie. Ukázalo se, že CGM v reálném čase je nejúčinnějším nástrojem pro snížení GV a že k jejímu zlepšení dojde bez ohledu na to, jestli pacienti používají k aplikaci inzulínu inzulínovou pumpu nebo inzulínová pera. Rozhodující tedy není ve většině případů způsob podávání inzulínu, ale používání CGM.

12.2. Závěr

Jedním z důležitých biomarkerů, který může souviset s komplikacemi diabetu je zvýšená GV. Výsledky naší práce ukázaly, že GV vypočítaná z kontinuální monitorace, ale nikoliv z dat získaných glukometry, je signifikantně vyšší u pacientů s přítomnými mikrovaskulárními komplikacemi, přestože se tito pacienti neliší v koncentraci HbA_{1c} ani v průměrné glykémii zjištěné pomocí CGM. Tento výsledek podporuje hypotézu, že vyšší GV u DM 1. typu může souviset s rozvojem komplikací a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace diabetu. Navíc se ukázalo, že stanovení GV pomocí SMBG je nepřesné. Proto je k výsledkům studií, které počítají GV z běžných profilů glykémie, nutno přistupovat obezřetně a k dalšímu výzkumu je nezbytné používat data získaná pomocí kontinuální monitorací glykémie.

Pro hodnocení GV zatím není akceptována žádná standardní metoda. V naší studii stanovení komplexnějších parametrů nepřineslo více informací oproti jednodušším způsobům výpočtu, mezi které patří určení GV pomocí celkové směrodatné odchylky (SD_T) nebo variačního koeficientu. S ohledem na jednoduchý výpočet SD_T , který v současné době provádějí automaticky všechny programy pro analýzu záznamů z CGM, ji lze snadno použít v klinické praxi.

V neposlední řadě výsledky této dizertační práce přispěly k vytvoření nového modelu pro výzkum GV *in vitro*. Nový model vychází z GV skutečných pacientů a odráží tak lépe reálnou situaci, kterou lze očekávat u pacientů s DM 1. typu.

Jako první jsme v dlouhodobé prospektivní studii ukázali, že GV a další parametry kompenzace diabetu lze v současné době nejefektivněji snížit použitím dlouhodobé kontinuální monitorace glykémie.

Při jednáních se zdravotními pojišťovnami přispěly v roce 2016 výsledky našeho výzkumu k úhradě CGM z prostředků veřejného zdravotního pojištění pro pacienty s DM 1. typu mimo jiné i v indikaci pro zvýšenou glykemickou variabilitu.

13. Summary

This work was focused on new biomarkers in the diagnosis and treatment of diabetic complications. Glycemic variability (GV), on which this work was mainly concentrated, is one of them. Moreover, with the help of CGM, we are now able to reliably describe, calculate and reduce GV.

Although there is increasing evidence of an association between GV and the risk of developing both microvascular and macrovascular complications in type 2 diabetes, this has not been found consistently in patients with type 1 diabetes. This is quite interesting because patients with type 1 diabetes are usually considered more homogeneous than patients with type 2 diabetes. We believe that the homogeneity of the patient group is very important. We intentionally decided to perform the study in patients with type 1 diabetes. These patients usually lack the other components of metabolic disorder so typical for patients with type 2 diabetes. This should increase the chance of proving an association between GV and complications in type 1 diabetes.

In our analysis, patients with microvascular complications had significantly higher GV as calculated from CGM data than the patients without complications, although they did not differ in glycemic control. The results of our study support the hypothesis that higher GV may be associated with microvascular complications in patients with type 1 diabetes and that HbA_{1c} alone may not describe diabetes control and the risk of complications completely. In contrast to our findings, retrospective analyses of the DCCT/EDIC found no significant relationship between GV and the development of retinopathy, nephropathy, and diabetic neuropathy. Nevertheless, regarding GV, there are limitations to the DCCT/EDIC. First, the DCCT was not primarily designed to assess GV. Second, and most importantly, for the estimation of GV the authors used five- to seven-point blood glucose profiles taken quarterly. However, even when five- to seven-point glucose profiles are obtained daily, certain potentially important peaks or nadirs will be missed. The results of our study suggest that four-point glucose profiles are not sufficient to match GV to complications, whereas CGM data allows us to reveal the association clearly. In that context, it is important to emphasize that although several studies have been published about the clinical impact of GV, relatively little attention has been paid to the datasets from which GV has been calculated. The range of datasets varies from five to seven-point glucose measurements taken at 3-month intervals

used in the DCCT to 70 measurements over 4 weeks reported by Bragd et al. and CGM at 5-min intervals described by Monnier and Colleagues. There is a study published by Baghurst et al. dealing with the minimum frequency of glucose measurements from which GV can be consistently assessed. These data showed that GV estimated by SD_T becomes unreliable if observations are more than 2–4 h apart and that MAGE becomes unreliable if glucose measurements are more than 1 h apart. CGM therefore should be preferable to SMBG as a source of data for the calculation of GV because it can capture all its complexity. Many different parameters are used to describe GV. Some parameters have a very simple formula (SD and CV); some are more complex (MAGE). Our results suggest that the more complex parameters provide no additional information over SD_T or CV. Based on our study we cannot, of course, conclude that SD_T and CV are the best parameters of GV for all situations. However, thanks to their simplicity they are easy to calculate routinely as a component of diabetes care and in experiment. Our study comparing GV of patients with and without microvascular complications was not prospective. This is the main limitation of this study. Only a large international prospective study would be able to definitively answer the question of whether GV increases the risk of microvascular complications. On the other hand, such a study would need to include thousands of patients with a short duration of diabetes so they had not had sufficient time to develop diabetic complications. These patients would have to be followed up for many years. In addition, GV would have to be measured by blinded CGM. Last but not least, with improving therapeutic options, GV in enrolled patients would likely decrease over the years. The necessity of long-term use of blinded CGM would make this study very expensive and probably would worsen the quality of life of potential participants because patients would not see an immediate benefit.

For these reasons, we will likely have to rely on indirect evidence from smaller clinical and pathophysiological studies carried out, for example, *in vitro* on cell cultures. The effect of GV on cell phenotypes has been investigated *in vitro* and it has been shown that GV may have more a deleterious effect on cells than high glucose itself. However, methodology used to study GV *in vitro* differs significantly between studies and does not reflect the *in vivo* situation. Our study was the first research on cell cultures where glycemic profiles created according to CGM records of real patients with type 1 diabetes and healthy volunteers were used. Our data indicate that increased GV, corresponding to GV of real patients, may have a similar or even greater effect than continuous hyperglycaemia on the expression of several genes relevant to pathogenesis of microvascular complications.

Higher GV is associated with increased incidence of hypoglycemia and possibly contributes to the development of diabetic complications. Moreover, it negatively affects quality of life and well-being of patients and represents an important barrier in the effort to improve diabetes control. Thus, it is important to reduce GV. It has been proven that higher GV in patients with type 1 diabetes might be decreased by using long-acting insulin analogues, insulin pumps and probably by real-time CGM. However, it is not clear which of these treatment modalities is the most effective in reducing GV because these treatment options have not been simultaneously compared in any prospective study. Therefore, a further objective of our work was to compare the influence of real-time CGM and the classic SMBG alternative on parameters of diabetes control, including GV in patients with type 1 diabetes treated by insulin pumps or multiple daily injections (MDI). Our study showed that long term use of RT-CGM led to a significant reduction of GV, HbA_{1c} and time spent in hypoglycemia. The reduction of GV and other parameters in patients with RT-CGM was greater than in patients with insulin pumps or MDI alone. Importantly, both subgroups of patients using RT-CGM (patients on pumps and on MDI) showed comparable improvements. Our study was the first 1-year prospective study simultaneously comparing four different treatment strategies based on different combinations of insulin delivery and monitoring systems. We have shown that RT-CGM is the most effective tool for reducing GV and that the improvement occurs regardless of insulin delivery method.

In conclusion. Increased GV is one of the important markers that may also be associated with diabetic complications. Our results showed that GV calculated from CGM, but not from the data obtained by glucometers (SMBG), are significantly higher in patients with microvascular complications, although there was no significant difference in HbA_{1c} or mean blood glucose. These results support the hypothesis that higher GV may be associated with microvascular complications in patients with type 1 diabetes and that HbA_{1c} alone may not describe diabetes control and the risk of complications completely. Moreover, it has been shown that the calculation of GV from SMBG is misleading. Thus, the results of studies that calculated GV from common glucose profiles should be considered with caution and, for further research, it is necessary to use CGM.

Many different parameters are used to describe GV, but still no gold standard exists. Our results suggest that the more complex parameters provide no additional information over total standard deviation (SD_T) or coefficient of variation (CV). With respect to SD_T , as it is

calculated automatically by all current programs for the analysis of CGM, it is simple to use it routinely as a component of diabetes care.

Last but not least, the results of this dissertation have contributed to the introduction of a new way of research into GV *in vitro*. The new model is based on GV profiles of real patients and thus reflects better actual situations that could be expected in patients with type 1 diabetes.

We were the first to, in a long-term prospective study, demonstrate that GV can currently be reduced most effectively by regular usage of real-time CGM. During the negotiations with Czech health insurance companies in 2016, the results of our research contributed to the introduction of reimbursement of CGM for patients with type 1 diabetes based on the indication, amongst other indicators, of increased glycemic variability.

14. Vlastní publikace autora

14.1. Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce:

Šoupal J, Škrha J Jr, Fajmon M, Horová E, Mráz M, Škrha J, Prázný M. Glycemic variability is higher in type 1 diabetes patients with microvascular complications irrespective of glycemic control. *Diabetes Technol Ther.* 2014 Apr;16(4):198-203. **IF 2,198**

Šoupal J, Petruželková L, Flekač M, Pelcl T, Matoulek M, Daňková M, Škrha J, Svačina Š, Prázný M. Comparison of different treatment modalities for Type 1 diabetes Including Sensor-Augmented Insulin Regimens in 52-weeks follow-up: a COMISAIR study. *Diabetes Technol Ther.* 2016. **IF 2,198**

Kuricová K, Pácal L, Šoupal J, Prázný M, Kaňková K. Effect of glucose variability on pathways associated with glucotoxicity in diabetes: Evaluation of a novel in vitro experimental approach. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016 Apr;114:1-8. **IF 3,045**

Škrha J, Šoupal J, Škrha J Jr, Prázný M. Glucose variability, HbA_{1c} and microvascular complications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016 Mar;17(1):103-10. **IF 5,088**

Škrha J Jr, Šoupal J, Loni Ekali G, Prázný M, Kalousová M, Kvasnička J, Landová L, Zima T, Škrha J. Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2013;2013:650694. **IF 1,89**

Horová E, Mazoch J, Hiigertová J, Kvasnička J, Škrha J, Šoupal J, Prázný M. Acute hyperglycemia does not impair microvascular reactivity and endothelial function during hyperinsulinemic isoglycemic and hyperglycemic clamp in type 1 diabetic patients. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:851487. **IF 1,528**

14.2. Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce:

Šoupal J, Prázný M. Glykemická variabilita. DMEV. 2012;162-169.

Šoupal J, Prázný M. Kontinuální monitorace glykémie jako nástroj pro odhalení nočních hypoglykemií. Kazuistiky v diabetologii 11, 4: 28–30, 2013.

Šoupal J. Snížení výskytu závažných hypoglykemií při kontinuální monitoraci glykémie v reálném čase. Kazuistiky v diabetologii 11, 4: 34–36, 2013.

Prázný M, Šoupal J. Glykemická variabilita and kontinuální monitorace glykémie. Vnitr Lek. 2014 Sep;60(9):757-63.

Šoupal J. Kontinuální monitorace glukózy u pacientů s režimem bazál-bolus. Acta medicae 2/2016.

Prázný M, Škrha J, Šoupal J, Škrha J. jr.: Krátkodobá a dlouhodobá glykemická variabilita a její vztah k mikrovaskulárním komplikacím diabetu. Vnitr Lek. 2016 Fall;62(Suppl 4):85-93.

14.3. Publikace s IF, které nejsou podkladem disertační práce:

Petruželková L, Picková K, Šumník Z, Šoupal J, Obermannová B. Effectiveness of SmartGuard technology in the prevention of nocturnal hypoglycemia after prolonged physical activity. V dubnu 2017 akceptováno k publikaci v Diabetes Technol Ther. **IF 2,198**

Rychlíková J, Vecka M, Jáchymová M, Macášek J, Hrabák P, Zeman M, Vávrová L, Šoupal J, Krechler T, Žák A. Osteopontin as a discriminating marker for pancreatic cancer and chronic pancreatitis. Cancer Biomark. 2016 Jun 7;17(1):55-65. **IF 1,736**

14.4. Publikace bez IF, které nejsou podkladem disertační práce:

Šoupal J, Svačina Š. Komplexní účinek gliflozinů na kardiovaskulární systém u pacientů s diabetem. Postgraduální medicína 2016, ročník 18, č. 1

Šoupal J, Prázný M. Postavení nových antidiabetik v klinické praxi: SGLT-2 versus DPP-4 inhibitory. Vnitř Lék 2015; 61(4): 291-294.

Šoupal J. Individualizace léčby diabetu 2. typu: GLP-1 agonisté. Kazuistiky v diabetologii 13, 3: 23– 26, 2015

Šoupal J, Prázný M. Kontrola glykémie u pacientů s akutním infarktem myokardu. Interv Akut Kardiol 2011; 10(2);67-71.

Škrha J Jr, Šoupal J, Prázný M, Škrha J. Glycation of lens proteins in diabetes and its non-invasive assessment - first experience in the Czech Republic. Vnitř Lék. 2015 Apr;61(4):346-50.

Flekač M, Šoupal J. Clinical efficacy and safety of basal insulin analogue glargine in patients with type 2 diabetes mellitus. Vnitř Lék. 2016 Fall;62(9):705-711.

Svobodová Š, Šoupal J, Svačina Š. Přínos kontinuální monitorace glykémie u pacientky s diabetem 2. typu. Kazuistiky v diabetologii 14, 4: 13–16, 2016.

Prázný M, Šoupal J. Účinnost a bezpečnost linagliptinu - význam pro klinickou praxi. Interní Med. 2014; 16(2): 62-66.

Prázný M, Šoupal J, Horová E. Novinky v prevenci a léčbě diabetes mellitus 1. typu: biologická léčba u diabetu 1. typu a nové trendy ve vývoji inzulínových pump. Postgraduální medicína 3/2012.

15. Použitá literatura

1. Alemzadeh R, Palma-Sisto P, Holzum M, Parton E, Kicher J. Continuous subcutaneous insulin infusion attenuated glycemic instability in preschool children with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2007; 9:339-347.
2. American Diabetes Association Workgroups on Hypoglycemia: Defining and reporting hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:1245-1249.
3. Anderson Jr JH, Brunelle RL, Keohane P, Koivisto VA, Trautmann ME, Vignati L, DiMarchi R. Mealtime treatment with insulin analog improves postprandial hyperglycemia and hypoglycemia in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. Multicenter Insulin Lispro Study Group. *Arch Intern Med* 1997; 157:1249-1255.
4. Baghurst PA, Rodbard D, Cameron FJ. The minimum frequency of glucose measurements from which glycemic variation can be consistently assessed. *J Diabetes Sci Technol* 2010;4:1382–1385.
5. Bailey T, Bode BW, Christiansen MP, Klaff LJ, Alva S. The Performance and Usability of a Factory-Calibrated Flash Glucose Monitoring System. *Diabetes Technol Ther*. 2015 Nov;17(11):787-94.
6. Battelino T, Conget I, Olsen B, Schütz-Fuhrmann I, Hommel E, Hoogma R, Schierloh U, Sulli N, Bolinder J; SWITCH Study Group.. The use and efficacy of continuous glucose monitoring in type 1 diabetes treated with insulin pump therapy: a randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2012 Dec;55(12):3155-62.
7. Bellastella G, Maiorino MI, Olita L, Della Volpe E, Giugliano D, Esposito K. Premature ejaculation is associated with glycemic control in Type 1 diabetes. *J Sex Med*. 2015 Jan;12(1):93-9.
8. Boulton AJ, Armstrong DG, Albert SF, Frykberg RG, Hellman R, Kirkman MS, Lavery LA, Lemaster JW, Mills JL Sr, Mueller MJ, Sheehan P, Wukich DK; American Diabetes Association; American Association of Clinical Endocrinologists: Comprehensive foot examination and risk assessment: a report of the Task Force of the Foot Care Interest Group of the American Diabetes Association, with endorsement by the American Association of Clinical Endocrinologists. *Diabetes Care* 2008;31:1679–1685.
9. Bragd J, Adamson U, Backlund LB, Lins PE, Moberg E, Oskarsson P. Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade? *Diabetes Metab* 2008; 34:612-616.

10. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-820.
11. Bruttomesso D, Crazzolara D, Maran A, Costa S, Dal Pos M, Girelli A, Lepore G, Aragona M, Iori E, Valentini U, Del Prato S, Tiengo A, Buhr A, Trevisan R, Baritussio A. In type 1 diabetic patients with good glycaemic control, blood glucose variability is lower during continuous subcutaneous insulin infusion than during multiple daily injections with insulin glargine. *Diabet Med* 2008; 25:326-332.
12. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation*. 2002 Sep 3;106(10):1211-8.
13. Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes* 2005; 54:1-7.
14. Cox DJ, Kovatchev BP, Julian DM, Gonder-Frederick LA, Podonsky WH, Schlundt DG, Clarke WL. Frequency of severe hypoglycemia in insulin-dependent diabetes mellitus can be predicted from self-monitoring blood glucose data. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1659-1662.
15. Cryer PE, Davis SN, Shamon H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1902-1912.
16. Cryer PE. Severe hypoglycemia predicts mortality in diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35(9): 1814–1816.
17. De Fronzo RA, Hendler R, Christensen N. Stimulation of counterregulatory hormonal responses in diabetic man by a fall in glucose concentration. *Diabetes* 1980; 29:125–131.
18. Egi M, Bellomo R, Stachowski E, French CJ, Hart G. Variability of blood glucose concentration and shortterm mortality in critically ill patients. *Anesthesiology* 2006; 105:244–252.
19. El-Laboudi AH, Godsland IF, Johnston DG, Oliver NS. Measures of Glycemic Variability in Type 1 Diabetes and the Effect of Real-Time Continuous Glucose Monitoring. *Diabetes Technol Ther*. 2016 Dec;18(12):806-812.
20. Garg SK, Schwartz S, Edelman SV. Improved glucose excursions using an implantable real-time continuous glucose sensor in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004 Mar;27(3):734-8
21. Gorst C, Kwok CS, Aslam S, Buchan I, Kontopantelis E, Myint PK, Heatlie G, Loke Y, Rutter MK, Mamas MA. Long-term Glycemic Variability and Risk of Adverse

- Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. 2015 Dec;38(12):2354-69.
22. Gorus F, Mathieu C, Gerlo E. How should HbA1c measurements be reported? *Diabetologia* 2006; 49:7-10.
 23. Gubitosi-Klug RA; DCCT/EDIC Research Group. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: summary and future directions. *Diabetes Care*. 2014;37(1):44-9.
 24. Henderson JN, Allen KV, Deary IJ, Frier BM. Hypoglycemia in insulin-treated type 2 diabetes: frequency, symptoms and impaired awareness. *Diabet Med* 2003; 20:1016-1021.
 25. Hermann JM, Hammes HP, Rami-Merhar B, Rosenbauer J, Schütt M, Siegel E, Holl RW; DPV Initiative the German BMBF Competence Network Diabetes Mellitus.. HbA1c variability as an independent risk factor for diabetic retinopathy in type 1 diabetes: a German/Austrian multicenter analysis on 35,891 patients. *PLoS One*. 2014 Mar 7;9(3):e91137.
 26. Hermansen K, Davies M, Derezinski T, Martinez Ravn G, Clauson P, Home P, on behalf of the Levemir Treat-to-Target Study Group. A 26-week, randomized, parallel, treat-to-target trial comparing insulin detemir with NPH insulin as add-on therapy to oral glucose-lowering drugs in insulin-naïve people with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29:1269-1274.
 27. Hietala K, Wadén J, Forsblom C, Harjutsalo V, Kytö J, Summanen P, Groop PH; FinnDiane Study Group.. HbA1c variability is associated with an increased risk of retinopathy requiring laser treatment in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013 Apr;56(4):737-45.
 28. Hirakawa Y, Arima H, Zoungas S, Ninomiya T, Cooper M, Hamet P, Mancia G, Poulter N, Harrap S, Woodward M, Chalmers J. Impact of visit-to-visit glycemic variability on the risks of macrovascular and microvascular events and all-cause mortality in type 2 diabetes: the ADVANCE trial. *Diabetes Care*. 2014 Aug;37(8):2359-65.
 29. Hirsch IB, Brownlee M. The effect of glucose variability on the risk of microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30:186-187.
 30. Horová E, Prázdny M. Endothelial dysfunction: Cause, Consequences and methods assessment. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2009; 139-147.
 31. Horváth EM, Benko R, Kiss L, Murányi M, Pék T, Fekete K, Bárány T, Somlai A, Csordás A, Szabo C. Rapid 'glycaemic swings' induce nitrosative stress, activate

- poly(ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2009 May;52(5):952-61.
32. Hsu CC, Chang HY, Huang MC, Hwang SJ, Yang YC, Lee YS, Shin SJ, Tai TY. HbA1c variability is associated with microalbuminuria development in type 2 diabetes: a 7-year prospective cohort study. *Diabetologia*. 2012 Dec;55(12):3163-72.
 33. Iwasaki S, Kozawa J, Fukui K, Iwahashi H, Imagawa A, Shimomura I. Coefficient of variation of R-R interval closely correlates with glycemic variability assessed by continuous glucose monitoring in insulin-depleted patients with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015 Aug;109(2):397-403.
 34. Jeha GS, Karaviti LP, Anderson B, Smith EO, Donaldson S, McGirk TS, Haymond MW. Insulin pump therapy in preschool children with type 1 diabetes mellitus improves glycemic control and decreases glucose excursions and the risk of hypoglycemia. *Diabetes Technol Ther* 2005; 7:876-884.
 35. Jones SC, Saunders HJ, Qi W, Pollock CA. Intermittent high glucose enhances cell growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabetologia*. 1999
 36. Jun JE, Jin SM, Baek J, Oh S, Hur KY, Lee MS, Lee MK, Kim JH. The association between glycemic variability and diabetic cardiovascular autonomic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2015 Jun 4;14:70.
 37. Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group. Effectiveness of continuous glucose monitoring in a clinical care environment: evidence from the Juvenile Diabetes Research Foundation continuous glucose monitoring (JDRF-CGM) trial. *Diabetes Care*, 2010, 33, 17–22.
 38. Kang S, Creagh FM, Peters JR, Brange J, Vølund A, Owens DR. Comparison of subcutaneous soluble human insulin and insulin analogues (AspB9, GluB27; AspB10; AspB28) on meal-related plasma glucose excursions in type I diabetic subjects. *Diabetes Care* 1991; 14:571-577.
 39. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. A1c variability and the risk of microvascular complications in type 1 diabetes: data from the DCCT. *Diabetes Care* 2008; 31:2198-2202.
 40. Kishimoto M, Yamasaki Y, Kubota M, Arai K, Morishima T, Kawamori R, Kamada T. 1,5-Anhydro-D-glucitol evaluates daily glycemic excursions in well-controlled NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18:1156-1159.

41. Kovatchev B, Cobelli C. Glucose Variability: Timing, Risk Analysis, and Relationship to Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care*. 2016 Apr;39(4):502-10.
42. Kovatchev BP, Cox DJ, Gonder-Frederick LA, Clarke WL. Methods for quantifying self-monitoring blood glucose profiles exemplified by an examination of blood glucose patterns in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2002; 4:295-303.
43. Kovatchev BP, Cox DJ, Gonder-Frederick LA, Young-Hyman D, Schlundt D, Clarke WL. Assessment of risk for severe hypoglycemia among adults with IDDM: validation of the low blood glucose index. *Diabetes Care* 1998; 21:1870-1875.
44. Kovatchev BP, Otto E, Cox D, Gonder-Frederick L, Clarke W. Evaluation of a new measure of blood glucose variability in diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29:2433-2438.
45. Krinsley JS. Glycemic variability: a strong independent predictor of mortality in critical ill patients. *Crit Care Med* 2008; 36:3008-3013.
46. Kudva YC, Basu A, Jenkins GD, Pons GM, Vogelsang DA, Rizza RA, Smith SA, Isley WL. Glycemic variation and hypoglycemia in patients with well-controlled type 1 diabetes on a multiple daily insulin injection program with use of glargine and ultralente as basal insulin. *Endocr Pract* 2007; 13:244-250.
47. Kwai NC, Arnold R, Poynten AM, Krishnan AV. Association between glycemic variability and peripheral nerve dysfunction in type 1 diabetes. *Muscle Nerve*. 2016 Nov;54(5):967-969.
48. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN, for the DCCT/EDIC Research Group. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the Diabetes Control and Complications Trial–Revisited. *Diabetes* 2008; 57:995-1001.
49. Martín-Cora FJ, Fornal CA, Metzler CW, Jacobs BL. Insulin-induced hypoglycemia decreases single-unit activity of serotonergic medullary raphe neurons in freely moving cats: relationship to sympathetic and motor output. *Eur J Neurosci*. 2002 Aug;16(4):722-34.
50. McCall AL, Cox DJ, Brodows R, Crean J, Johns D, Kovatchev B. Reduced daily risk of glycemic variability: comparison of exenatide with insulin glargine. *Diabetes Technol Ther* 2009; 11:339-344.
51. McDonnell CM, Donath SM, Vidmar SI, Werther GA, Cameron FJ. A novel approach to continuous glucose analysis utilizing glycemic variation. *Diabetes Technol Ther* 2005; 7:253-263.

52. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295:1681-1687.
53. Nalysnyk L, Hernandez-Medina M, Krishnarajah G. Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:288–298.
54. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993 Sep 30;329(14):977-86.
55. Nazim J, Fendler W, Starzyk J. Metabolic control and its variability are major risk factors for microalbuminuria in children with type 1 diabetes. *Endokrynol Pol* 2014; 65(2): 83–89.
56. Penno G, Solini A, Bonora E, Fondelli C, Orsi E, Zerbini G, Morano S, Cavalot F, Lamacchia O, Laviola L, Nicolucci A, Pugliese G. Renal Insufficiency And Cardiovascular Events Study Group.. HbA1c variability as an independent correlate of nephropathy, but not retinopathy, in patients with type 2 diabetes: the Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian multicenter study. *Diabetes Care*. 2013 Aug;36(8):2301-10.
57. Pickup JC, Kidd J, Burmiston S, Yemane N. Determinants of glycaemic control in type 1 diabetes during intensified therapy with multiple daily insulin injections or continuous subcutaneous insulin infusion: importance of blood glucose variability. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22:232-23.
58. Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A. Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 May-Jun;22(3):198-203.
59. Prázný, M. Selfmonitoring glykemie a přesnost glukometrů. *Interní Med*, 2013, 15, 206–209.
60. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes*. 2003 Nov;52(11):2795-804.

61. Riddle MC, Rosenstock J, Gerich J. The Treat-to-Target Trial: randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2003; 26:3080-3086.
62. Rodbard D. Continuous Glucose Monitoring: A Review of Successes, Challenges, and Opportunities. *Diabetes Technol Ther*. 2016 Feb;18 Suppl 2:S23-213
63. Rodbard D. The challenges of measuring glycemic variability. *J Diabetes Sci Technol*. 2012 May 1;6(3):712-5.
64. Saisho Y. Glycemic variability and oxidative stress: a link between diabetes and cardiovascular disease? *Int J Mol Sci* 2014; 15(10): 18381–18406.
65. Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species. Impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res* 2015; 64(1): 53–66.
66. Samsom M, Akkermans LM, Jebbink RJ, van Isselt H, vanBerge-Henegouwen GP, Smout AJ. Gastrointestinal motor mechanisms in hyperglycaemia induced delayed gastric emptying in type I diabetes mellitus. *Gut*. 1997 May;40(5):641-6.
67. Sharma D, Morrison G, Joseph F, Purewal TS, Weston PJ. The role of continuous subcutaneous insulin infusion therapy in patients with diabetic gastroparesis. *Diabetologia*. 2011 Nov;54(11):2768-70.
68. Schlichtkrull J, Munck O, Jersild M. The M-value, an index of blood sugar control in diabetics. *Acta Med Scand* 1965; 177:95-102.
69. Siegelar SE, Frits Holleman, Joost B. L. Hoekstra, J. Hans De Vries. Glucose Variability; Does it matter? *Endocrine Reviews* 2010; 31:171-182.
70. Siegelar SE, Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL, Hoekstra JB, Devries JH. Glucose variability does not contribute to the development of peripheral and autonomic neuropathy in type 1 diabetes: data from the DCCT. *Diabetologia* 2009; 52:2229-2232.
71. Soranzo N. Genetic determinants of variability in glycated hemoglobin (HbA(1c)) in humans: review of recent progress and prospects for use in diabetes care. *Curr Diab Rep*. 2011 Dec;11(6):562-9.
72. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321:405-412.
73. Su G, Mi S, Tao H, Li Z, Yang H, Zheng H, Zhou Y, Ma C. Association of glycemic variability and the presence and severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2011 Feb 25;10:19..

74. Škrha J. Diabetologie. Praha: Galén, 2009.
75. Šoupal J., Prázný M. Kontrola glykémie u pacientů s akutním infarktem myokardu. *Interv Akut Kardiol* 2011; 10(2):67-71.
76. Takeuchi A, Throckmorton DC, Brogden AP, Yoshizawa N, Rasmussen H, Kashgarian M. Periodic high extracellular glucose enhances production of collagens III and IV by mesangial cells. *Am J Physiol.* 1995 Jan;268(1 Pt 2):F13-9.
77. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1997; 46:271-286.
78. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The absence of a glycemic threshold for the development of longterm complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1996; 45: 1289-1298.
79. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1995; 44:968-983.
80. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853
81. Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in critically ill patients. *N Engl J Med* 2001; 345:1359–1367.
82. Wentholt IM, Kulik W, Michels RP, Hoekstra JB, DeVries JH. Glucose fluctuations and activation of oxidative stress in type 1 diabetes patients. *Diabetologia* 2008; 51:183-190.
83. White NH, Chase HP, Arslanian S, Tamborlane WV. Acomparison of glycemic variability associated with insulin glargine and intermediate-acting insulin when used as the basal component of multiple daily injections for adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:387-393.
84. Xu F, Zhao LH, Su JB, Chen T, Wang XQ, Chen JF, Wu G, Jin Y, Wang XH. The relationship between glycemic variability and diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes with well-controlled HbA1c. *Diabetol Metab Syndr.* 2014 Dec 15;6(1):139.
85. Yamamoto C, Miyoshi H, Fujiwara Y, Kameda R, Ichiyama M, Nomoto H, Kameda H, Nakamura A, Atsumi T. Degludec is superior to glargine in terms of daily glycemic variability in people with type 1 diabetes mellitus. *Endocr J.* 2016;63(1):53-60.15.

16. Prohlášení zájemce o nahlédnutí do disertační práce

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta

Kateřinská 32, Praha 2

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí
do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis